

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

**ESTUDIO DE LAS INTERNEURONAS  
ESTRIATALES Y DE SU RELACIÓN CON EL  
COMPARTIMENTO ESTRIOSOMAL. UN  
ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO EN  
EL CEREBRO HUMANO NORMAL**

TESIS DOCTORAL

Javier Bernácer María

Madrid, 2006





**ESTUDIO DE LAS INTERNEURONAS  
ESTRIATALES Y DE SU RELACIÓN CON EL  
COMPARTIMENTO ESTRIOSOMAL. UN  
ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO EN  
EL CEREBRO HUMANO NORMAL**

**Tesis Doctoral presentada por**

**JAVIER BERNÁCER MARÍA**

**Directores:**

**José Manuel Giménez Amaya**

Catedrático de Anatomía y Embriología

**Lucía Prensa Sepúlveda**

Doctora en Medicina y Cirugía

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2006



*A mi familia.  
A Carol.*

“Ahora no queda sino suplicar al benévolo lector que al formular su fallo inapelable, mire, antes que a lo mezquino del resultado, al esfuerzo y tiempo que ha requerido el conseguirlo, y sobre todo, a la intención por demás sana y patriótica que ha guiado al autor”

*Santiago Ramón y Cajal. “Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados”, 1899.*

“No se puede desatar un nudo sin saber cómo está hecho”  
*Aristóteles.*



## AGRADECIMIENTOS

Después de terminar el grueso del texto y las ilustraciones de esta Tesis Doctoral, me dispongo a expresar por escrito mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado, tanto en el desarrollo de mi labor investigadora como en la elaboración de este texto. Y siento por ello una gran presión, pues soy consciente de que ésta será la sección más leída de mi Tesis Doctoral.

Antes de concretar mi agradecimiento en nombres propios, me gustaría aclarar que no es mi intención mencionar a todos aquellos que me han dado apoyo intelectual o moral en estos casi cinco años, porque después de haber pasado por tres laboratorios distintos eso sería imposible. Por ello, si alguien lee por encima el texto que sigue y no encuentra su nombre, lejos de sentirse decepcionado debe saber que estas letras se perderán o caerán en el olvido, pero mi gratitud permanecerá siempre.

Gracias al Profesor Giménez Amaya, José Manuel, por haberme dado la oportunidad de comenzar con él mi carrera investigadora, y por adoptar el papel de mentor, consejero, compañero de bromas o amigo según la ocasión lo requiriera.

Gracias a la Doctora Prensa Sepúlveda, Lucía, por haber invertido en mi formación una cantidad infinita de horas; más aún, gracias por la ilusión y la dedicación demostradas en esas horas. Gracias a los dos, en fin, por haber sido unos excelentes directores y haber traspasado la barrera de lo profesional en el momento oportuno.

Gracias al Departamento de Anatomía de la Universidad de Navarra, que me acogió en mis dos primeros años de Tesis. Gracias al Dr. Velayos, a la Dra. Irujo, al Dr. Ullán, a la Dra. Mengual, a Rafa, a Pedro, y especialmente a Mari Ángeles, una de las personas a las que no habría necesitado nombrar, pues ella sabe mejor que nadie el agradecimiento y respeto que le debo. Gracias a mis compañeros doctorandos por los momentos vividos tanto en la Universidad como fuera de ella. En este momento estoy valorando si sería capaz de escribir todos vuestros nombres, pero me doy cuenta de que aunque lo hiciera no podría expresar mi enorme agradecimiento. Por eso, os invito a que penséis en alguna anécdota especial que hayamos vivido juntos. Si se te ocurre en menos de un minuto, date por mencionado en este texto. A mí se me ocurren cientos.

Gracias al Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Universidad Autónoma de Madrid, por haber enriquecido mi formación investigadora de un modo incalculable. Gracias al Profesor Reinoso Suárez, por su ejemplo tanto profesional como humano; al Dr. Llamas, por sus consejos y sentido del humor; al Dr.

Avendaño, por sus agudas sugerencias acerca de este trabajo; a la Dra. Rodrigo, por su cariño y simpatía, y por aquel maravilloso *tour* por Nueva Orleans; a la Dra. de Andrés por su ayuda y atención en ciertos aspectos de mi estancia en la Universidad; a la Dra. Cavada, al Dr. Garzón, y al Dr. Clascá, por suponer unos inmejorables modelos en los que basarme para comenzar mi carrera científica; gracias especialmente al Dr. Santamaría por sus consejos acerca de la metodología de este trabajo, que hicieron que mi Tesis cambiara de rumbo para adquirir una mayor consistencia. En definitiva, gracias a todos los profesores, personal técnico y administrativo de la Autónoma, por vuestra ayuda profesional y por haber creado un acogedor ambiente de trabajo.

Gracias, por supuesto, a mis compañeros de “habitación” en este Departamento: Mari Tere, Toñi, Victoria, Ibone, Maite, Raúl y Silvano, con quienes he compartido grandes momentos a lo largo de todo este tiempo. He de mencionar por segunda vez al Dr. de las Heras, Silvano, por su incansable ayuda con los aspectos “literarios” de la Ciencia, pese a los disgustos que a veces ha conllevado. Se podría decir que, si José Manuel y Lucía me han enseñado cómo ser un científico, Silvano me ha enseñado cómo parecerlo. Y gracias, cómo no, a mis compañeros doctorandos, tanto a la “vieja guardia” como a la “nueva hornada”. Gracias a todos por hacer que valieran la pena cuatro horas y media de viaje cada día, por respetar mi manera de ser sin intentar cambiarla, y por haberme hecho disfrutar de momentos memorables en este Departamento.

Brevemente, y aunque nunca vaya a leer este texto, me gustaría agradecer a la Profesora Suzanne Haber haberme acogido en su laboratorio durante seis meses, ya que para mí supuso una gran progresión tanto personal como profesional. Gracias también a todo su grupo en la Universidad de Rochester, y a aquellas personas que me ayudaron a disfrutar mi estancia allí.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia por su apoyo durante todo este tiempo, y por su continua evaluación (“¿Has descubierto algo ya?”). También a mis amigos, repartidos en diversos puntos del mundo, ya que cada uno de ellos ha tomado parte en lo que soy y en lo que quiero llegar a ser.

Y, por supuesto, gracias a Carol por nada en especial, pues lo que es imposible de expresar no puede ser escrito.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Visión anatómica general de los ganglios basales.....	3
1.2. Tipos neuronales del estriado .....	5
1.2.1. Neuronas de proyección .....	6
1.2.2. Interneuronas .....	9
1.3. Heterogeneidad química del estriado .....	15
1.3.1. Características químicas de la matriz .....	15
1.3.2. Características químicas del compartimento estriosomal.....	18
1.4. Flujo de la información nerviosa a través del estriado .....	21
1.4.1. Conexiones aferentes al estriado desde la corteza cerebral.....	22
1.4.2. Conexiones aferentes al estriado desde el tálamo .....	24
1.4.3. Conexiones aferentes al estriado desde la sustancia negra.....	27
1.4.4. Conexiones eferentes del estriado .....	28
1.4.5. Papel integrador de las interneuronas en el procesamiento de la información estriatal .....	31
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	39
3.1. Obtención y preparación del tejido humano.....	41
3.1.1. Recogida, preparación y fijación.....	41
3.1.2. Corte y almacenamiento .....	43
3.2. Procesamiento del tejido.....	43
3.2.1. Técnicas histoquímicas.....	45
3.2.2. Técnicas inmunohistoquímicas.....	47
3.2.3. Técnicas de doble marcaje.....	51
3.2.4. Procedimientos comunes .....	53
3.3. Análisis de los datos .....	54
3.3.1. División topográfica del estriado.....	54
3.3.2. Métodos para la caracterización morfológica de las interneuronas, del compartimento estriosomal, y de la relación entre ambos.....	56
3.3.3. Métodos para el estudio de la distribución neuronal .....	57
4. RESULTADOS .....	77
4.1. Descripción general de la anatomía química del estriado en toda su extensión anteroposterior.....	79
4.1.1. Anatomía química del estriado anterior.....	79

4.1.2. Anatomía química del estriado posterior.....	80
4.2. Análisis de las interneuronas nitrérgicas .....	82
4.2.1. Características morfológicas .....	83
4.2.2. Distribución a lo largo de los ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral .....	85
4.2.3. Organización con respecto al compartimento estriosomal .....	90
4.3. Análisis de las interneuronas colinérgicas.....	93
4.3.1. Características morfológicas .....	93
4.3.2. Distribución a lo largo de los ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral .....	95
4.3.3. Organización con respecto al compartimento estriosomal .....	100
4.4. Análisis de las interneuronas calbindina positivas .....	103
4.4.1. Características morfológicas .....	103
4.4.2. Distribución a lo largo de los ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral .....	106
4.4.3. Organización con respecto al compartimento estriosomal .....	110
4.5. Comparaciones entre los tres grupos de interneuronas .....	113
4.5.1. Prevalencia en las distintas regiones y sectores del estriado .....	113
4.5.2. Diferencias en la organización compartimental .....	115
5. DISCUSIÓN.....	295
5.1. Consideraciones metodológicas .....	297
5.1.1. División del estriado.....	297
5.1.2. Material humano y técnicas de marcaje empleadas.....	299
5.1.3. Estereología e interpretación estadística de los resultados.....	301
5.2. Anatomía química del estriado posterior.....	303
5.3. Interneuronas estriatales nitrérgicas .....	308
5.4. Interneuronas estriatales colinérgicas.....	318
5.5. Interneuronas estriatales calbindina positivas .....	328
5.6. El papel de las interneuronas estriatales en el conjunto de los ganglios basales y su implicación en procesos patológicos .....	334
6. CONCLUSIONES.....	341
7. ABREVIACIONES .....	345
8. BIBLIOGRAFÍA .....	349



## ***1. INTRODUCCIÓN***



### ***1.1. Visión anatómica general de los ganglios basales***

El estriado [denominado “cuerpo estriado” en la Nomenclatura Anatómica Ilustrada (Feneis y Dauber, 2003)] forma parte de un grupo de núcleos subcorticales denominados ganglios basales. En principio, se creyó que estos núcleos tenían como única función la transmisión de la información desde unas zonas corticales a otras, pasando por el tálamo. Sin embargo, diversos hallazgos demostraron que ciertas alteraciones de los componentes de los ganglios basales daban lugar a diferentes patologías con una sintomatología característica, y que podían afectar a funciones cognitivas, emotivas o motoras.

Los ganglios basales tienen cuatro componentes: el estriado, el globo pálido, la sustancia negra, y el núcleo subtalámico. No todos los autores coinciden en esta clasificación simplificada, y algunos añaden otras estructuras subcorticales como la formación reticular parabraquial de la protuberancia, el tubérculo olfatorio, la sustancia innominada, el núcleo basal de Meynert, o el núcleo tegmental pedunculopontino. Como el presente trabajo se refiere al estriado, uno de los principales núcleos de los ganglios basales, se tomará en consideración la clasificación general citada en primer lugar, idónea también para entender el flujo de la información a través de los ganglios basales.

El estriado está formado por una porción dorsal que ocupa casi todo su volumen, y que también es conocida como neostriado, y una región ventral denominada núcleo *accumbens*. El estriado dorsal se compone de dos núcleos de origen embrionario y composición celular idéntica: el núcleo caudado y el putamen. Ambos están separados por la cápsula interna, si bien en el tercio anterior quedan unidos por puentes de tejido estriatal.

El núcleo caudado es una estructura alargada en forma de *c* que sigue el recorrido del ventrículo lateral a lo largo de su asta anterior, cuerpo, y asta inferior. En el cerebro humano, su longitud es de aproximadamente ocho centímetros y su grosor es variable en los distintos niveles del eje anteroposterior. Este hecho ha facilitado la división del núcleo caudado en regiones distintas en atención a características anatómicas del propio núcleo, o de estructuras del sistema nervioso próximas a él, como la comisura anterior. El putamen es un núcleo ovoide en su región anterior, y que una

vez superada la comisura se alarga en el eje dorsoventral y se estrecha en el mediolateral. Su zona ventral postcomisural es una región de difícil análisis anatómico, ya que se fusiona con otros núcleos adyacentes como el complejo amigdalino, formando la transición estriadoamigdalina, o la cola del núcleo caudado, cuyo polo anterior está poco definido. La comisura anterior ha sido empleada clásicamente para dividir tanto al núcleo caudado como al putamen en dos regiones topográficamente diferenciadas, la zona precomisural y la postcomisural. La división del estriado llevada a cabo en este trabajo será tratada en el apartado ***Material y Métodos***.

El globo pálido es un complejo formado por tres porciones (lateral, medial y ventral) que se sitúa en posición medial con respecto al putamen, quedando de alguna manera cubierto por él. Aparece en un nivel ligeramente más anterior que la comisura anterior, y finaliza aproximadamente a la altura a la que empieza a aparecer el cuerpo geniculado lateral del tálamo. La porción lateral del globo pálido recibe también el nombre de globo pálido externo, y está separado del putamen por la lámina medular lateral. Es la porción de mayor tamaño y tiene forma de lente. La lámina medular medial lo separa del globo pálido medial, también denominado interno, más pequeño y esférico que el anterior. Ambas partes, comunicadas recíprocamente, presentan claras diferencias químicas y hodológicas que serán explicadas posteriormente. El globo pálido ventral aparece por debajo de la comisura anterior, y según algunos autores su parte posterior se corresponde con la sustancia innominada, dentro de la cual se encuentra el núcleo basal de Meynert.

El núcleo subtalámico es una estructura con forma de almendra que se sitúa ventral a la zona incerta y lateral al campo H de Forel. Además, su parte ventral limita con la sustancia negra, que aparece en un nivel algo más posterior. Esta última tiene dos porciones anatómica y funcionalmente bien diferenciadas: la porción compacta, situada en posición dorsal, y la reticulada, ventral con respecto a la anterior. El área tegmental ventral, situada en las zonas más mediales de la sustancia negra, es habitualmente incluida en las clasificaciones dentro de la sustancia negra. Tiene unas características bioquímicas muy similares a las de la porción compacta. Ambas cuentan con una población mayoritaria de células dopaminérgicas, aunque sus dianas preferenciales y sus funciones son distintas. Mientras que el área tegmental ventral proyecta principalmente al núcleo *accumbens* y al complejo amigdalino, la porción compacta lo hace al estriado dorsal. Las células de ésta, además, contienen melanina, gracias a lo

cual adquieren su característica pigmentación oscura. La porción reticulada de la sustancia negra está formada por células gabaérgicas, es decir, que emplean el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor.

En términos generales, el estriado es el punto de entrada de la información que llega a los ganglios basales, mientras que el globo pálido medial y la porción reticulada de la sustancia negra constituyen los núcleos de salida. Además, el estriado conecta con los denominados núcleos intrínsecos de los ganglios basales, que son principalmente el globo pálido lateral, el núcleo subtalámico y la porción compacta de la sustancia negra. Finalmente, los núcleos de salida transmiten la información al tronco cerebral y al tálamo. Éste último contacta con el estriado, dando lugar a un circuito de regulación de ambas estructuras, y envía la información de vuelta a la corteza.

### ***1.2. Tipos neuronales del estriado***

El estriado cuenta con dos tipos distintos de neuronas, según las dianas de sus axones sean el propio estriado u otros núcleos. Así, aquellas neuronas cuyo axón abandona el estriado e inerva a otras estructuras del sistema nervioso son conocidas como neuronas de proyección, mientras que aquellas cuyo axón no sale del estriado e inerva a otras neuronas estriatales son consideradas interneuronas. El hecho de que ambas presenten además características químicas y morfológicas distintas las hace susceptibles de ser distinguidas por técnicas de marcaje selectivo. Ramón y Cajal (1904) observó la presencia de estos tipos neuronales distintos, clasificándolas en neuronas de axón corto y largo. Este autor encontró distintos tipos de neuronas estriatales en atención al tamaño de su soma y a la longitud de su axón, clasificándolas en células medianas y pequeñas de axón corto (dentro de las cuales se incluye un grupo de neuronas enanas o neurogliformes), y células de axón largo y soma voluminoso (Ramón y Cajal, 1904). Existe un gran número de clasificaciones de las neuronas del estriado (Fox y cols., 1971b; Fox y cols., 1971a; Kemp y Powell, 1971c; DiFiglia y cols., 1976; Yelnik y cols., 1991), y todas ellas coinciden en observar la presencia de espinas sinápticas en las dendritas de las neuronas de proyección, y la ausencia de las mismas en las interneuronas. Uno de los aspectos más llamativos acerca de estas dos poblaciones de neuronas estriatales es la variación de su proporción según se asciende en la escala filogenética. Así, mientras el porcentaje de las neuronas de proyección es de alrededor del 95% en roedores (Yelnik y cols., 1991), en humanos esta cifra cae hasta el 75%

(Graveland y DiFiglia, 1985; Roberts y cols., 1996). Esta diferencia parece indicar la importancia de las interneuronas en la organización integradora y funcional del estriado de los primates.

### *1.2.1. Neuronas de proyección*

Las neuronas de proyección son aquéllas cuyo axón abandona el núcleo en el que se encuentra el soma, en este caso, el estriado. La principal característica de las neuronas de proyección estriatales es la presencia de espinas sinápticas en sus dendritas. Su tamaño es intermedio, con un diámetro de soma entre 12 y 20  $\mu\text{m}$ . Por estas dos características, las neuronas de proyección del estriado también son llamadas espinosas de tamaño mediano. Debido a la presencia de las espinas, estas células fueron fácilmente reconocidas a finales del siglo XIX y principios del XX con la técnica de impregnación de Golgi (Kölliker, 1896; Ramón y Cajal, 1904). Algunos autores del último cuarto del siglo XX defendieron la presencia de un segundo tipo de neuronas espinosas en el estriado humano (Rafols y Fox, 1979; Braak y Braak, 1982), que estaría caracterizado por un menor número de espinas en sus dendritas. Sin embargo, Yelnik y colaboradores (1991) desaconsejaron esta distinción, al considerar la densidad de las espinas dendríticas dependiente de factores como la edad del individuo, el tiempo post mórtem, o la propia técnica que las pone de manifiesto.

Las neuronas de proyección suelen tener entre 4 y 5 dendritas primarias y varias colaterales axónicas, y no presentan irregularidades en su envoltura nuclear (Graveland y DiFiglia, 1985). Otra característica morfológica importante de estas neuronas, descrita más recientemente, es la de tener un campo dendrítico muy reducido en volumen. Aproximadamente el 75% de las neuronas de proyección extienden sus dendritas en el mismo compartimento estriatal en el que se encuentra el soma (Walker y cols., 1993). Según describieron algunos de estos autores en un trabajo complementario (Walker y Graybiel, 1993), el árbol dendrítico de estas neuronas está polarizado, es decir, orientado en dirección anteroposterior, dorsoventral y mediolateral. Aunque su axón presenta múltiples colaterales, éstas también ocupan un volumen reducido, similar al de la arborización dendrítica (Kawaguchi y cols., 1990).

En cuanto a su composición química, las neuronas de proyección emplean el GABA como neurotransmisor, por lo que inhiben los núcleos a los que inervan.

Además, expresan tres tipos de neuropéptidos: encefalina, sustancia P y dinorfina (Haber, 1986). Éstos son péptidos opioides, con funciones analgésicas y relajantes, cuya función en el estriado parece ser suavizar el efecto de una estimulación repetitiva sobre las neuronas de proyección por parte de la dopamina u otro tipo de neurotransmisor (Steiner y Gerfen, 1998). Todavía hoy muchos autores clasifican a las neuronas de proyección en dos poblaciones distintas en atención a sus características químicas. Por una parte, estarían las neuronas con encefalina y receptores de dopamina del tipo D<sub>2</sub>, y por otra las que contienen sustancia P acompañada o no de dinorfina, y con receptores de dopamina del tipo D<sub>1</sub>. Según este modelo, el primer grupo estaría implicado en la llamada vía indirecta de los ganglios basales, y el segundo en la vía directa (Beckstead y Kersey, 1985; Haber y Watson, 1985; DeLong, 1990). Sin embargo, existen evidencias anatómicas que demuestran que esta clasificación de las neuronas de proyección no es del todo exacta, ya que los receptores de dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> pueden encontrarse en la misma neurona de proyección estriatal, y se han hallado axones estriatales ricos en sustancia P en núcleos de la denominada vía indirecta (Jakab y cols., 1996; Aizman y cols., 2000; Mounir y Parent, 2002). De hecho, el propio concepto de las vías directa e indirecta ha quedado en entredicho por determinados hallazgos anatómicos que serán comentados en su apartado correspondiente (Lévesque y Parent, 2005).

En cuanto a sus características electrofisiológicas, las neuronas espinosas de tamaño mediano no disparan constantemente, sino que lo hacen de forma repetitiva durante varios segundos al recibir un estímulo. Según Kawaguchi (1997), son neuronas muy activas manteniendo potenciales excitadores por debajo del umbral. Aunque no se encuentren disparando, no se puede decir que estas neuronas estén en reposo, sino que están continuamente ocupadas en decidir si descargan o no frente a episodios que pueden revertir su polaridad. A principios de los años 80 se comenzó a elaborar una teoría que definía a las neuronas de proyección estriatales como una de las dianas fundamentales de las propias neuronas de proyección, a través de colaterales axónicas. De esta manera, se formaría en el estriado una red inhibitoria responsable del control del movimiento (Wilson y Groves, 1980; Bolam y cols., 1983; Groves, 1983). Posteriormente, se comprobó que la fuerza inhibitoria de estas colaterales es débil, y que el principal control de las neuronas de proyección no procede de ellas mismas, sino de las interneuronas estriatales y de las proyecciones nigroestriatales (Kita, 1993; Jaeger y cols., 1994; Tepper y Bolam, 2004).

Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas espinosas estriatales pueden cambiar en función de las influencias que reciban de otras neuronas. Así, su patrón de descarga se puede ver alterado por una estimulación cortical persistente y por la acción de la acetilcolina o del óxido nítrico (Calabresi y cols., 2000b; Calabresi y cols., 2000a; Centonze y cols., 2003a). Recientemente, se ha comprobado que el GABA liberado por las neuronas de proyección o por las interneuronas, pese a ser un neurotransmisor considerado inhibitorio, es capaz de colaborar en la excitación de las propias neuronas espinosas por parte del glutamato cortical o talámico a través de receptores del tipo GABA A (Bracci y Panzeri, 2005). Esta acción parece depender del intervalo de tiempo que transcurre entre la acción gabaérgica y la llegada a la célula de un estímulo despolarizante. Los potenciales postsinápticos gabaérgicos eran capaces de alterar las despolarizaciones por debajo del umbral de excitación, y conseguir que superaran dicho umbral. Esta acción se producía con mayor efectividad cuando la estimulación gabaérgica precedía en 50-60 milisegundos a la corriente despolarizante.

En general, las neuronas de proyección del estriado reciben conexiones aferentes desde cuatro fuentes extraestriatales: la corteza cerebral, el tálamo, la sustancia negra, y, en mucha menor medida, el tronco del encéfalo. Esta diversidad de proyecciones aferentes se manifiesta también en el modo en que inervan a las neuronas espinosas. Así, las fibras corticales forman sinapsis asimétricas en la cabeza de las espinas, aunque también lo hacen directamente sobre la propia dendrita, siempre a nivel distal (Kemp y Powell, 1971b; Hattori y cols., 1979; Bouyer y cols., 1984). Las fibras talámicas, como las corticales, terminan en la porción distal del árbol dendrítico, aunque siempre en neuronas que no reciben proyecciones de la corteza (Sadikot y cols., 1992). Las sinapsis nigroestriatales suelen aparecer en las espinas distales, y especialmente en el cuello de aquellas espinas cuya cabeza está en contacto sináptico con fibras corticales (Bouyer y cols., 1984; Freund y cols., 1984). Por último, las fibras del tronco del encéfalo establecen sinapsis asimétricas tanto en las espinas como en el árbol dendrítico (Lavoie y Parent, 1990). El estudio de la conectividad estriatal aferente y eferente en la que participan las neuronas de proyección será desarrollado con mayor profundidad en el apartado correspondiente.



### 1.2.2. Interneuronas

En los primeros estudios acerca de la morfología de las neuronas estriatales, la descripción anatómica de las interneuronas no quedó del todo clara. Por ejemplo, tanto Ramón y Cajal como Kölliker afirmaron que las neuronas de “axón corto” podían presentar espinas sinápticas (Kölliker, 1896; Ramón y Cajal, 1904). Quizá uno de los estudios más importantes a este respecto es el de DiFiglia y colaboradores, que analizaron la morfología de las neuronas estriatales con la técnica de Golgi, diferenciándolas en tipo I (neuronas de proyección) y tipo II (interneuronas) (DiFiglia y cols., 1976). Fue en este trabajo en el que se determinó la ausencia de espinas en las dendritas de las interneuronas, y se observó su diversidad anatómica. Debido a aquellos estudios que demostraron la prevalencia de las neuronas de proyección sobre las interneuronas en el estriado, y a su gran variabilidad morfológica, las últimas empezaron a ser obviadas y los trabajos se centraron en las primeras (Goldman-Rakic y Selemon, 1990). Fue a principios y mediados de los años 90 cuando los estudios de Kawaguchi empezaron a demostrar la importancia de las interneuronas en la organización y procesamiento de la información estriatal, apoyados por el gran incremento en la proporción de interneuronas que aparecía en el ser humano con respecto a otras especies (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi y cols., 1995; Kawaguchi, 1997). Estos trabajos pusieron de manifiesto que las interneuronas eran responsables no sólo de la organización intrínseca del estriado, sino que también modulaban su información aferente y eferente. Además, se ha comprobado que la envoltura nuclear de las interneuronas, al contrario que la de las neuronas de proyección, cuenta con una gran cantidad de repliegues (Graveland y DiFiglia, 1985).

Tomando como modelo la segregación química de las neuronas de proyección estriatales (Beckstead y Kersey, 1985), se intentó caracterizar de la misma manera a las interneuronas. Así, llegaron a describirse los seis tipos que se conocen hoy día: **1)** interneuronas con óxido nítrico sintasa, neuropéptido Y, somatostatina y GABA (Kowall y cols., 1987; Bernácer y cols., 2005); **2)** interneuronas colinérgicas (DiFiglia, 1987); **3)** interneuronas con calbindina (Prensa y cols., 1998); interneuronas gabaérgicas con **4)** calretinina (Cicchetti y cols., 1998; Prensa y cols., 1998) y **5)** parvalbúmina (Cowan y cols., 1990; Prensa y cols., 1998); y, finalmente, **6)** neuronas dopaminérgicas (Betarbet y cols., 1997; Cossette y cols., 2005; Mazloom y Smith, 2006; Tande y cols., 2006). Esta clasificación, salvo el último grupo, queda perfectamente explicada en la

revisión de Cicchetti y colaboradores (2000). Las interneuronas con calbindina son consideradas gabaérgicas (Kawaguchi y cols., 1995), aunque este aspecto no ha sido totalmente confirmado en el ser humano

Es importante señalar también que varios trabajos han estudiado la diversidad química de las interneuronas estriatales, y han demostrado que los citados anteriormente son grupos independientes. Ahora bien, existe un cierto solapamiento entre alguno de los grupos. Así, un 20% de las interneuronas con óxido nítrico sintasa expresan también calbindina (Bennett y Bolam, 1993; Kawaguchi y cols., 1995). Además, alrededor de un 80% de las interneuronas de gran tamaño con calretinina parecen expresar también marcadores colinérgicos (Parent y cols., 1995; Cicchetti y cols., 2000).

En definitiva, las interneuronas estriatales presentan una gran diversidad química, morfológica, electrofisiológica y funcional, lo cual hace que su estudio sea muy interesante para avanzar en la comprensión de la funcionalidad del estriado humano. Esta Tesis Doctoral se centra en el análisis de las interneuronas con óxido nítrico sintasa, acetilcolina y calbindina por las razones que se citan en la sección ***Planteamiento y Objetivos***. Por ello, a continuación se profundizará especialmente en estos tres tipos de interneuronas estriatales.

a) Interneuronas nitrérgicas:

Este grupo neuronal es capaz de emplear óxido nítrico como neurotransmisor gracias a la óxido nítrico sintasa, también conocida como NADPH-diaforasa (Dawson y cols., 1991; Hope y cols., 1991). Suponen alrededor del 1% del total de neuronas estriatales (Kawaguchi, 1993). Este grupo neuronal expresa también somatostatina (Smith y Parent, 1986; Dawson y cols., 1991), neuropéptido Y (Vincent y cols., 1983; Rushlow y cols., 1995), y, pese a las dudas iniciales (Kawaguchi y cols., 1995), su naturaleza gabaérgica ha sido totalmente aceptada (Tepper y Bolam, 2004). Todo esto las convierte en el tipo neuronal del estriado que expresa mayor cantidad de moléculas neuroactivas. La liberación del gas difusible óxido nítrico, que se produce cuando hay despolarizaciones de larga duración, se asocia tanto a un control del flujo de sangre local (Bredt y Snyder, 1992), como a la facilitación de la liberación de otros neurotransmisores en función del ambiente químico estriatal (Trabace y Kendrick, 2000). Se han llevado a cabo varias clasificaciones de la morfología de estas interneuronas estriatales (Kowall y cols., 1987; Johannes y cols., 2003; Bernácer y cols.,

2005). Aunque algunas de ellas no abarcaron toda la extensión del estriado, las tres coinciden en definir la morfología de estas neuronas como triangular, bipolar u ovoide con un número variable de dendritas primarias (entre una y ocho), y un soma mediano (entre 9 y 30  $\mu\text{m}$ ).

Sus características fisiológicas son exclusivas, presentando potenciales de acción mantenidos de bajo umbral. Su actividad produce corrientes postsinápticas inhibitorias de larga duración en la neurona de proyección (Tepper y Bolam, 2004). Reciben aferencias principalmente de la corteza cerebral, el globo pálido lateral, la porción compacta de la sustancia negra, y las interneuronas colinérgicas (Aoki y Pickel, 1988; Vuillet y cols., 1989b; Vuillet y cols., 1989a; Vuillet y cols., 1992; Kawaguchi y cols., 1995), y recientemente se ha visto que las neuronas de proyección que expresan sustancia P dejan colaterales en esta población neuronal (Li y cols., 2002b). Como interneuronas, su axón inerva a otras células del propio estriado. A través del GABA, inhiben a las neuronas de proyección estriatales (Kawaguchi y cols., 1995). Por medio del óxido nítrico, son capaces de favorecer la liberación de otros neurotransmisores a través de la vía de la guanilato ciclasa o del peroxinitrito. En el primer caso, de modo general favorecen la liberación de acetilcolina, serotonina, glutamato y GABA. En el segundo, la de dopamina (Trabace y Kendrick, 2000).

Las interneuronas nitrérgicas estriatales están relacionadas con la plasticidad sináptica. La potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*) y la depresión a largo plazo (LTD, del inglés *long term depression*) son dos formas de plasticidad sináptica que afectan a las proyecciones corticoestriatales (Calabresi y cols., 1996). La descarga repetitiva de las terminales corticales sobre las interneuronas nitrérgicas produce una despolarización larga, que se traduce en la síntesis y liberación de óxido nítrico. Éste, a través de la vía de la guanilato ciclasa actúa sobre los receptores de glutamato AMPA de la neurona de proyección, disminuyendo su sensibilidad al glutamato cortical (Centonze y cols., 1999).

#### b) Interneuronas colinérgicas:

Este grupo está formado por las neuronas de mayor tamaño del estriado, con un soma que oscila entre las 20 y las 50  $\mu\text{m}$ , y suponen entre el 1 y el 2% del total de la población neuronal del estriado (Cicchetti y cols., 2000). Tanto Ramón y Cajal como otros autores de la segunda mitad del siglo XX las consideraron neuronas de proyección

(Ramón y Cajal, 1904; Fox y cols., 1971a; Kemp y Powell, 1971a), aunque posteriormente se confirmó la teoría de Kölliker que las había descrito como interneuronas (Kölliker, 1896; Woolf y Butcher, 1986). El mejor marcador inmunohistoquímico para definir esta población es la colina acetiltransferasa, enzima fundamental en su síntesis, ya que la técnica histoquímica de la acetilcolinesterasa marca también algunas neuronas que contienen somatostatina (Mesulam y cols., 1984). Las interneuronas colinérgicas son la principal fuente de acetilcolina y de sus sustancias relacionadas en el estriado (Butcher y Hodge, 1976), y son un grupo fácilmente identificable al no expresar otros marcadores como la óxido nítrico sintasa, calbindina o parvalbúmina (Geula y cols., 1993; Selden y cols., 1994b; Kawaguchi y cols., 1995), aunque alrededor de un 80% de las interneuronas de gran tamaño con calretinina parecen expresar también marcadores colinérgicos (Parent y cols., 1995; Cicchetti y cols., 2000). Presentan un soma ovoide, triangular, fusiforme o poligonal del cual emergen entre dos y cinco dendritas primarias que suelen producir otras dendritas finas, varicosas, y frecuentemente ramificadas (Cicchetti y cols., 2000).

En cuanto a sus propiedades electrofisiológicas, estas neuronas presentan un patrón de descarga muy particular que les ha dado el sobrenombre de neuronas tónicamente activas (TANs, del inglés *tonically active neurons*) (Aosaki y cols., 1994b; Aosaki y cols., 1995). Descargan tónica pero irregularmente, debido a que están despolarizadas y su potencial de reposo queda próximo al umbral de descarga (Wilson y cols., 1990). Según se ha visto en posteriores estudios, es posible que no todas las neuronas tónicamente activas del estriado sean interneuronas colinérgicas, y que no todas éstas tengan las mismas propiedades fisiológicas (Tepper y Bolam, 2004). El modo de respuesta que tienen estas neuronas frente a procesos generalmente asociados a recompensa o a un evento desagradable es la pausa en su descarga, que ocurre de un modo sincronizado unos 200 milisegundos después de la presentación del estímulo (Aosaki y cols., 1994b).

Las interneuronas colinérgicas del estriado están recíprocamente relacionadas con las terminales glutamatérgicas de la corteza cerebral y del tálamo, con terminales dopaminérgicas de la porción compacta de la sustancia negra, y con terminales gabaérgicas de las interneuronas y neuronas de proyección estriatales (Hernández-López y cols., 1997; Hernández-Echeagaray y cols., 1998; Galarraga y cols., 1999; Koós y Tepper, 2002; Pérez-Roselló y cols., 2005). La actuación de la acetilcolina en el

estriado se suele realizar a través de los receptores muscarínicos de tipo  $M_1$  y  $M_2$  localizados en las terminales citadas (Alcántara y cols., 2001). Las propias interneuronas colinérgicas cuentan con autorreceptores de tipo  $M_2$  que controlan su nivel de descarga.

En cuanto al papel de las interneuronas colinérgicas en el estriado humano, su función es variada y compleja. Como se ha citado anteriormente, se vio que respondían a estímulos que predecían una recompensa (Kimura y cols., 1984). Después se comprobó que su modo de respuesta era una pausa, y que lo hacían tanto frente a estímulos auditivos como a estímulos visuales (Aosaki y cols., 1994b). Si bien se desconoce la naturaleza exacta de esta pausa, se observó que dependía de las aferencias estriatales procedentes de la sustancia negra y del tálamo, ya que al degenerar estas vías la respuesta desaparecía (Zhou y cols., 2002). Además, la neuronas colinérgicas del núcleo caudado parecen responder a los estímulos de un modo distinto a como lo hacen las del putamen (Aosaki y cols., 1994b; Pisani y cols., 2001; Apicella, 2002; Kimura y cols., 2003; Morris y cols., 2004; Yamada y cols., 2004). Otra función importante a la que están ligadas las interneuronas colinérgicas es la plasticidad sináptica del estriado. Del mismo modo que las interneuronas nitrérgicas facilitan la LTD, las colinérgicas favorecen la LTP. La actuación de la acetilcolina sobre receptores de tipo  $M_1$  en las neuronas de proyección promueve una cascada celular que activa a la proteinquinasa C, lo cual resulta en la facilitación de los receptores de glutamato NMDA para captar con mayor efectividad el neurotransmisor que procede de las terminales corticoestriatales (Centonze y cols., 1999). Todas estas funciones que derivan de las particulares características fisiológicas de las interneuronas colinérgicas son la causa del gran número de trabajos dedicados a estas neuronas, a las que se les atribuye una gran importancia en la organización y procesamiento de la información que recibe y envía el estriado.

c) Interneuronas con calbindina:

El estriado humano presenta tres tipos distintos de interneuronas, posiblemente gabaérgicas, que contienen proteínas ligadoras de calcio: neuronas con calbindina, calretinina, y parvalbúmina. Estas tres proteínas pertenecen a la familia “EF-hand”, denominada así por su conformación tridimensional. Su papel es la captación del calcio intracelular, manteniéndolo a unos niveles adecuados para que se dé la respuesta pertinente, sin resultar excitotóxico. Todas las neuronas estriatales parvalbúmina

positivas son interneuronas, mientras que dentro de las calretinina positivas hay un pequeño grupo que por su morfología se consideran neuronas de proyección (Prensa y cols., 1998). En el caso de las calbindina positivas resulta lo contrario: la inmensa mayoría de ellas son neuronas de proyección, y unas pocas son interneuronas (Prensa y cols., 1998). De hecho, esta molécula es empleada como marcador de las neuronas de proyección del estriado (Gerfen y cols., 1985; DiFiglia y cols., 1989; Gerfen, 1992). La técnica inmunohistoquímica de la calbindina revela una gran cantidad de neuronas de soma oval o redondeado de tamaño mediano (18-24  $\mu\text{m}$ ) con un marcaje débil y granular. Debido a la poca intensidad de la tinción, no es posible observar la morfología de las dendritas. Además, aparece una pequeña población de neuronas de mayor tamaño (20-26  $\mu\text{m}$ ) intensamente teñidas, con soma oval del cual emergen dos o tres dendritas primarias escasamente ramificadas (Prensa y cols., 1998). A las neuronas débilmente marcadas se les consideró neuronas de proyección debido a su tamaño, número y morfología (Bennett y Bolam, 1993; Selden y cols., 1994b). Por medio de inyecciones retrógradas en la porción reticulada de la sustancia negra de la rata, se comprobó que las neuronas calbindina positiva inervaban este núcleo (Gerfen y cols., 1985). Esto supuso un hallazgo llamativo, ya que hasta el momento se creía que las neuronas de proyección del sistema nervioso central expresaban parvalbúmina (Celio y cols., 1988; Celio, 1990). Las neuronas con un marcaje intenso fueron consideradas interneuronas por sus diferencias morfológicas con respecto a las neuronas de proyección (Prensa y cols., 1998). Una pequeña población de interneuronas con calbindina fue también descrita en rata (Roberts y DiFiglia, 1990). Entre un 20 y un 40% de las interneuronas con calbindina del estriado de primates expresan también óxido nítrico sintasa, por lo que, aunque ambos grupos se solapan, hay que entender a las interneuronas con calbindina como un grupo independiente.

Debido al reciente descubrimiento de estas interneuronas en el estriado humano, y su escaso número en roedores y primates no humanos, no existen apenas datos sobre sus características fisiológicas o sus conexiones dentro del estriado. Es de suponer que, al tratarse posiblemente de interneuronas gabaérgicas, su papel sea similar al de las interneuronas con calretinina o parvalbúmina, es decir, llevar a cabo una potente inhibición de las neuronas de proyección. Estas neuronas tienen una frecuencia de descarga muy elevada, y producen potenciales postsinápticos inhibitorios en las neuronas de proyección (Koós y Tepper, 2002). Además, forman uniones de tipo nexo

entre ellas, dándose un acople electrotónico y una mayor efectividad en la inhibición (Tepper y cols., 2004).

### ***1.3. Heterogeneidad química del estriado***

Aunque clásicamente el estriado era considerado una estructura homogénea, a principios de los años setenta comenzaron a desarrollarse una serie de trabajos que contradijeron esta idea. Dichos estudios comenzaron demostrando por medio de técnicas de fluorescencia que las terminales nigroestriatales se organizaban en “islas” tanto en la rata como en el conejo (Olson y cols., 1972; Tennyson y cols., 1972). Posteriormente, se descubrió que algunos receptores opiáceos se distribuían a modo de mosaico en el estriado de la rata (Pert y cols., 1975; 1976). También se observó la tendencia de algunas células del estriado a formar agrupaciones (Mensah, 1977). Pero fue sin duda el trabajo de Graybiel y Ragsdale (1978) el que sirvió como punto de partida a una gran cantidad de estudios acerca de la heterogeneidad química del estriado. En él se describe la presencia de dos compartimentos químicos bien diferenciados en el estriado del gato, del mono y del hombre, en función de la intensidad de marcaje de la técnica histoquímica de la acetilcolinesterasa. Los autores denominaron matriz al mayor de los compartimentos, y a los parches, cuerpos estriatales o estriosomas.

#### ***1.3.1. Características químicas de la matriz***

La matriz es el compartimento que ocupa alrededor del 80% del volumen estriatal (Graybiel, 1990). En principio se definió como un territorio rico en la enzima acetilcolinesterasa, lo cual podría implicar una importante actividad colinérgica en el estriado de los mamíferos, que resultó proceder de las interneuronas del propio núcleo (Graybiel y Ragsdale, 1978; Mesulam y cols., 1984; Holt y cols., 1996). La abundancia de acetilcolinesterasa en la matriz correspondía al marcaje de dopamina que se había descubierto anteriormente (Graybiel y cols., 1981), y más adelante se comprobó que también contenía una gran cantidad de lugares de captación de dopamina (Graybiel y Moratalla, 1989). Éste hecho podría sugerir que los efectos funcionales de algunas drogas psicoactivas podrían estar relacionados con estos lugares de captación de dopamina (Graybiel y Moratalla, 1989). Sin embargo, el contenido en neurotransmisores, neuromoduladores y receptores no siempre es mayor en la matriz

que en el otro compartimento estriatal. De hecho, Pert y colaboradores (1976) observaron que la densidad de receptores opiáceos en lo que más tarde se consideraría la matriz, era menor que en los posteriormente denominados estriosomas, y que el marcaje correspondía con el descrito para la enzima acetilcolinesterasa (Herkenham y Pert, 1981). Así pues, en los primeros estudios anatómicos la matriz fue descrita como un territorio rico en acetilcolinesterasa y dopamina, y pobre en receptores opiáceos.

Simultáneamente a estos estudios, otros trabajos en roedores y en primates no humanos acerca de las proyecciones aferentes del estriado, demostraron que la mayoría de éstas terminaban formando agrupaciones o parches. Esto se observó en las proyecciones procedentes de la corteza prefrontal dorsolateral que llegaban al núcleo caudado (Goldman y Nauta, 1977), de la corteza motora primaria y somatosensorial que llegaban al putamen (Kunzle, 1975; Jones y cols., 1977; Kunzle, 1977), y del tálamo (Kalil, 1978; Royce, 1978a; Hontanilla y cols., 1994; Giménez-Amaya y cols., 1995; de las Heras y cols., 1997; 1998b; Mengual y cols., 1999; Giménez-Amaya y cols., 2000), a las que hay que sumar las ya mencionadas procedentes de la sustancia negra (Olson y cols., 1972; Tennyson y cols., 1972). Además, se vio que las eferencias estriatales también aparecían compartimentadas (Giménez-Amaya y Graybiel, 1990; 1991). La relación que existe entre esta compartimentación hodológica del estriado y la química mencionada anteriormente no ha quedado del todo clara, si bien parece que los dos tipos de regionalización no corresponden completamente (Holt y cols., 1997). A aquellos parches que formaban las proyecciones aferentes estriatales en la matriz se los denominó matrisomas o cuerpos de la matriz (Graybiel y cols., 1991; Walker y Graybiel, 1993; Flaherty y Graybiel, 1994; Eblen y Graybiel, 1995). Aunque las conexiones del estriado serán analizadas con mayor detenimiento en el cuarto apartado de la **Introducción**, este breve comentario se menciona aquí para poner de manifiesto que la matriz no es un compartimento homogéneo.

La técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa fue también empleada para distinguir la matriz de los estriosomas. En este caso, como en el de la acetilcolinesterasa, la matriz parecía expresar una mayor actividad de la enzima que los estriosomas, aunque la correspondencia con otros marcadores no quedó del todo clara (Sandell y cols., 1986). La presencia de la proteína de membrana asociada al sistema límbico (LAMP, del inglés *limbic system associated membrane protein*) fue estudiada en el estriado del gato (Chesselet y cols., 1991), mono (Côté y cols., 1995) y humano



(Prensa y cols., 1999). Su mayor abundancia en los estriosomas con respecto a la matriz indicaba un papel de éstos en el sistema límbico que la matriz no poseía. Pero fue con el estudio de las proteínas ligadoras de calcio calbindina, calretinina y parvalbúmina cuando se abrió un importante campo de estudio en la heterogeneidad estriatal. La primera de éstas en ser analizada fue la calbindina, cuya presencia en la matriz era mayor que en los estriosomas (Gerfen y cols., 1985; Graybiel, 1990). Con respecto a la parvalbúmina, el patrón era muy similar (Waldvogel y Faull, 1993). Por último, en el caso de la calretinina, se observó una mayor presencia de la proteína dentro de los estriosomas, mostrando un patrón inverso al de las otras dos moléculas de la misma familia (Parent y cols., 1996). Morel y colaboradores (2002) llegaron incluso a dividir el estriado humano en distintas regiones según la expresión de estas proteínas. Así, estos autores distinguieron cuatro zonas en el estriado humano, tres de las cuales correspondían al estriado dorsal. El territorio T1 abarcaba el putamen posterior, y se caracterizaba por un nivel alto de parvalbúmina, moderado de calbindina y bajo de calretinina en la matriz; T2, que incluía el putamen anterior y todo el núcleo caudado salvo la parte más anterior, presentaba en la matriz una expresión moderadamente alta de parvalbúmina, muy alta de calbindina, y baja de calretinina; y T3, correspondiente al putamen anteroventral y parte del núcleo caudado a este nivel, tenía un nivel bajo de parvalbúmina, muy alto de calbindina, y moderado de calretinina en la matriz. Según estos autores, T1 correspondía al estriado sensorimotor, T2 al asociativo y T3 al paralímbico.

En resumen, la matriz del estriado humano es rica en acetilcolinesterasa, NADPH-diaforasa, dopamina, calbindina y parvalbúmina, con respecto al compartimento estriosomal.

Según propusieron Bolam y colaboradores (1988) y más tarde confirmaron Penny y colaboradores (1988), la organización de la compartimentación estriatal parece llevarse a cabo por medio de las neuronas de proyección, mientras que la relación entre los dos compartimentos es establecida por las interneuronas. La presencia de éstas parece ser mayor en la matriz que en los estriosomas. Las primeras en estudiarse fueron aquéllas inmunorreactivas frente a la somatostatina, que después fueron identificadas con las que contenían óxido nítrico sintasa y neuropéptido Y, como ya se ha descrito anteriormente (Chesselet y Graybiel, 1986). En este último caso, las investigadoras observaron que las interneuronas se situaban principalmente en la matriz, aunque

algunas de ellas ocupaban también los estriosomas. Además, tendían a situarse en el límite entre los dos compartimentos, y un número reducido de sus prolongaciones atravesaba los límites compartimentales.

Poco después del último estudio citado, Chesselet y Robbins (1989) estudiaron la distribución de las interneuronas gabaérgicas con respecto a los estriosomas, esperando que éstas coincidieran con las neuronas diaforasa positivas. Sin embargo, vieron que no correspondían en todos los casos, concluyendo que ambas tenían que formar dos poblaciones neuronales independientes. Como se ha descrito más arriba, las interneuronas gabaérgicas engloban posiblemente cuatro tipos de neuronas estriatales distintos: las nitrérgicas, y los tres grupos que contienen proteínas ligadoras de calcio (calbindina, calretinina y parvalbúmina). En este trabajo, los autores encontraron a las neuronas gabaérgicas tanto en la matriz como dentro de los estriosomas, aunque era de suponer que la mayoría de estas células correspondiera a las neuronas de proyección estriatales. En trabajos posteriores, tanto las interneuronas que expresan calretinina como las que expresan parvalbúmina también fueron descritas en los dos compartimentos (Prensa, 1998). Por último, y con respecto a las interneuronas colinérgicas, su presencia parecía ser mayor en aquellas zonas con una mayor cantidad de acetilcolinesterasa, es decir, en la matriz estriatal (Holt y cols., 1996), aunque también se encontraban en los límites de los estriosomas (Aosaki y cols., 1995).

### *1.3.2. Características químicas del compartimento estriosomal*

Los “cuerpos estriatales” o estriosomas constituyen un compartimento estriatal de organización intrincada y composición heterogénea (Prensa y cols., 1999). Este compartimento como tal fue descrito por Graybiel y Ragsdale (1978) en el gato, mono y hombre, aunque previamente se habían realizado algunos descubrimientos que demostraban ya cierto grado de heterogeneidad en el estriado de los roedores (Olson y cols., 1972; Tennyson y cols., 1972; Pert y cols., 1976). En los primeros trabajos, se definió a los estriosomas como unos parches redondeados o alargados que predominaban en la cabeza del núcleo caudado (Graybiel y Ragsdale, 1978). Sin embargo, ya desde el principio se insistió en que no se podía tachar a los estriosomas de simples “parches”, porque entre cortes adyacentes había una clara continuidad (Graybiel y Ragsdale, 1978). De esta manera, el compartimento estriosomal fue precisado más bien como un laberinto tridimensional que aparecía en toda la extensión del estriado

dorsal. También se pensó que esta división compartimental podía aplicarse al estriado ventral (núcleo *accumbens*) (Graybiel y cols., 1981), pero pronto se demostró que la complejidad química de éste necesitaba una caracterización independiente (Alheid y Heimer, 1988; de Olmos y Heimer, 1999; Prensa y cols., 2003).

Los estriosomas han demostrado tener distinta concentración de neurotransmisores, neuropéptidos, y receptores que la matriz. Además, sus conexiones aferentes y eferentes también son distintas, aspecto éste que será tratado en el siguiente apartado de esta **Introducción**. Pero el nivel de complejidad estriatal no se quedaba simplemente en una doble compartimentación estriatal (Giménez-Amaya, 1993). Prensa y colaboradores demostraron que el compartimento estriosomal cuenta a su vez con dos regiones distintas en el cerebro humano, centro y periferia (Prensa, 1998; Prensa y cols., 1999). Aunque ya con anterioridad se había descrito la forma “anular” de algunos estriosomas (Holt y cols., 1997), estos investigadores caracterizaron químicamente el centro y la periferia estriosomal en regiones anteriores y posteriores. En los estriosomas de zonas anteriores, la periferia era rica en los neuropéptidos encefalina y sustancia P, LAMP, calbindina y calretinina. La matriz presentaba un patrón opuesto salvo en el caso de la calbindina y la parvalbúmina, en el que el marcaje era muy similar al de la periferia. En cuanto al centro estriosomal, presentaba unos niveles moderados (intermedios entre el marcaje de la periferia y el de la matriz) de encefalina, LAMP, calretinina y acetilcolinesterasa, un alto nivel de sustancia P, y carecía de las proteínas ligadoras de calcio calbindina y parvalbúmina. La principal diferencia con respecto a los estriosomas de zonas posteriores aparecía en el marcaje de calbindina y tirosina hidroxilasa, marcador dopaminérgico. En el caso de la proteína fijadora de calcio, la periferia de los estriosomas posteriores aparecía más teñida que la matriz, algo que no se daba en regiones anteriores. En cuanto a la tirosina hidroxilasa, cuya presencia era prácticamente nula tanto en la periferia como en el centro de los estriosomas de la zona anterior, presentaba un marcaje más intenso que la matriz en los dos compartimentos estriosomales. Además de la apariencia descrita en forma de parche de los estriosomas, Pert y colaboradores describieron la presencia de una banda subcallosa en el estriado de la rata con características químicas similares a las del compartimento estriosomal (Pert y cols., 1976; Prensa y Parent, 2001).

La distribución de las interneuronas estriatales también demuestra algunas diferencias con respecto a la heterogeneidad estriosomal. Las interneuronas nitrérgicas

aparecen tanto en el centro como en la periferia estriosomal, aunque en menor número comparado con su presencia en la matriz (Prensa, 1998). Además, parecen agruparse en algunas zonas de la matriz circundante a la periferia estriosomal (Prensa, 1998). Las interneuronas colinérgicas, que según se ha descrito previamente corresponden en gran medida a las calretinina positivas de gran tamaño, aparecen especialmente en los límites internos y externos de la periferia (Prensa, 1998). Las interneuronas parvalbúmina positivas, sin embargo, aparecen en mayor cantidad en el centro estriosomal que en su periferia (Prensa, 1998).

En cuanto a la densidad sináptica en el interior de los estriosomas y en la matriz, parecen existir diferencias significativas entre el núcleo caudado y el putamen. Roberts y Knickman (2002) demostraron que en el núcleo caudado hay una mayor densidad sináptica (16%) dentro de los estriosomas con respecto a la matriz, mientras que en el putamen la diferencia (22%) es en este caso a favor de la matriz. Los autores emplearon el marcaje inmunohistoquímico de la calbindina, con lo cual se asume que estudiaron el centro estriosomal, y no la periferia (Prensa y cols., 1999; Roberts y Knickman, 2002). Como se ha mencionado anteriormente, el centro del estriosoma posee un menor número de interneuronas que la periferia y la matriz, lo cual justificaría una disminución de las sinapsis simétricas dentro de los estriosomas. Esta predicción se cumple en el putamen, mientras que en el núcleo caudado la densidad de las sinapsis simétricas axoespinosas de los estriosomas supera a las que se detectan en la matriz, no siendo así el caso de las sinapsis simétricas axodendríticas. Las sinapsis perforadas, que son un claro indicador de plasticidad sináptica, también tienen una mayor densidad en los estriosomas que en la matriz del núcleo caudado, mientras que en el putamen el patrón es inverso (Roberts y Knickman, 2002).

En resumen, el compartimento estriosomal es un laberinto tridimensional con unas características químicas y hodológicas distintas de las del resto del territorio estriatal. Además, la parte central de los estriosomas presenta también diferencias con respecto a la zona periférica de los mismos. Es también digno de mención el que algunas interneuronas estriatales, en función de su localización selectiva, puedan servir de puente para la transmisión de información entre los distintos compartimentos.

#### ***1.4. Flujo de la información nerviosa a través del estriado***

Durante décadas de estudio acerca de las conexiones de los ganglios basales y su relación con la corteza y el tálamo, se han elaborado dos teorías principales que tratan de explicar el flujo de la información a través de los ganglios basales, y que tiene su primera estación en el estriado. La primera de estas teorías defiende que la transmisión de la información se da a modo de *circuitos paralelos* independientes (Alexander y cols., 1986; Alexander y Crutcher, 1990; Hoover y Strick, 1993). De este modo, distintas zonas de la corteza cerebral enviarían sus proyecciones eferentes a distintas regiones del estriado, que mantendrían esta segregación en sus proyecciones hacia el resto de núcleos de los ganglios basales. La especificidad de la información se conservaría del mismo modo en los núcleos talámicos, y volvería a la corteza a las zonas en las que se había iniciado el flujo cortical. Hasta el momento, se han identificado cinco de estos circuitos en los ganglios basales: motor, oculomotor, dorsolateral prefrontal, lateral orbitofrontal y cíngulo anterior.

La segunda teoría (Percheron y Filion, 1991) propone que el estriado sirve de *embudo* para concentrar la información que procede de distintas áreas corticales, y enviarla al resto de núcleos de los ganglios basales. Las proyecciones corticales terminarían en parches en el estriado, los cuales se relacionarían para concentrar la información en el globo pálido y la sustancia negra. El amplio árbol dendrítico de las neuronas palidales y nigrales, en contraste con los axones estriatales escasamente ramificados, facilitarían la convergencia de la información procedente de las proyecciones eferentes estriatales, de origen parcheado (Parent y Hazrati, 1995). De esta manera, la información no discurriría por una serie de circuitos paralelos independientes, sino que las proyecciones procedentes de distintas regiones corticales confluirían en el estriado, y la información sería transmitida como un único bloque a través del globo pálido, la sustancia negra y el tálamo. Después, volvería a la corteza como una mezcla de las distintas modalidades funcionales que iniciaron el circuito.

Sin embargo, los estudios anatómicos que se están llevando a cabo en la actualidad, especialmente los del grupo del Profesor Parent en Canadá y los de la Doctora Prensa en nuestro país, sugieren que ninguno de estos dos modelos debe ser tomado como punto de referencia único para comprender el flujo de la información a través de los ganglios basales. La complejidad de las proyecciones neuronales que

subyace de su alto grado de colateralización y la función reguladora de las interneuronas, impide la aceptación sin restricciones de un modelo que, aunque resulte explicativo, no deja de ser una simplificación de la realidad anatómica (Prensa y Parent, 2001; Haber, 2003; Cebrián y cols., 2005; Lévesque y Parent, 2005; Parent y Parent, 2005).

#### *1.4.1. Conexiones aferentes al estriado desde la corteza cerebral*

Prácticamente toda la corteza cerebral proyecta al estriado, siendo la corteza sensorimotora y la visual las que tienen, respectivamente, mayor y menor representación en estas conexiones (Parent, 1990; Giménez-Amaya, 1991; Haber, 2003). Los axones proceden de neuronas corticales situadas en capas supragranulares e infragranulares, dependiendo del compartimento estriatal al que proyecten (Gerfen, 1989). Las proyecciones corticoestriatales pueden ser contralaterales o ipsilaterales, siendo infrecuentes aquellas neuronas que envían colaterales axónicas a ambos hemisferios (Fisher y cols., 1984).

Desde 1970, se han elaborado distintos patrones para explicar el modo en que las proyecciones corticales terminan en el estriado. En primer lugar, Kemp y Powell (1970) propusieron que cada región cortical proyectaba de forma restringida a la zona del estriado que quedaba más próximo a ella, con un pequeño territorio de solapamiento. Así, por ejemplo, la corteza prefrontal proyectaría a la porción anterior del estriado. En consecuencia, este modelo atribuiría a los axones corticales una arborización estriatal topográficamente muy restringida. Se trataría así de una transmisión de la información completamente lineal, en la que cada región de la corteza proyectaría únicamente a su homóloga en el estriado según una topografía de vecindad muy estricta.

Más tarde, una gran cantidad de trabajos realizados en regiones asociativas de la corteza cerebral, demostraron que éstas proyectaban a regiones estriatales que se extendían ampliamente en el eje anteroposterior (Kunzle, 1975; Goldman y Nauta, 1977; Kunzle, 1977; Graybiel y Ragsdale, 1979; Nauta, 1982; Selemon y Goldman-Rakic, 1985). De hecho, se sugirió que este patrón podría seguirse en todas las proyecciones corticoestriatales, al demostrarse que regiones no adyacentes de la corteza cerebral tenían una representación topográfica adyacente en el estriado (Selemon y Goldman-Rakic, 1985). Esta explicación contradice el modelo propuesto por Kemp y

Powell (1970), ya que, por ejemplo, regiones anteriores de la corteza cerebral pueden proyectar a zonas posteriores del estriado. Sin embargo, más tarde se demostró que el modelo de Kemp y Powell no era del todo desacertado, y se propuso el modelo de las proyecciones preferentes (Saint-Cyr y cols., 1990). Según él, si bien una región cortical puede enviar sus proyecciones a toda la extensión del estriado, hay una zona estriatal que recibe preferentemente estas conexiones (Cavada y Goldman-Rakic, 1991). Por lo tanto, esta explicación supondría una síntesis entre los dos modelos anteriores, y sienta las bases para la elaboración del siguiente modelo, que es el que se acepta actualmente (Parent, 1990; Haber, 2003).

Las cortezas asociativas, sensorimotoras y límbicas proyectan de un modo topográficamente ordenado al estriado, dividiéndolo en territorios funcionalmente distintos (Parent, 1990; Haber y Johnson, 2004). Así, en el territorio asociativo convergen las proyecciones procedentes de las distintas regiones corticales de naturaleza asociativa. A modo de ejemplo, el territorio asociativo del estriado recibe la información de las regiones asociativas de la corteza, la procesa, y la envía a las regiones asociativas del resto de núcleos de los ganglios basales (Parent, 1990; Parent y Hazrati, 1995; Haber, 2003). El estriado *asociativo* está formado por casi todo el núcleo caudado y el putamen anterior, y recibe los axones de las porciones asociativas del lóbulo frontal, temporal y parietal; el estriado *sensorimotor* es el putamen postcomisural y la porción dorsolateral del núcleo caudado postcomisural, y recibe las proyecciones de la corteza motora primaria y somatosensorial; por último, el estriado *límbico* es el núcleo *accumbens*, la porción ventral del núcleo caudado y del putamen, y recibe los axones de las cortezas límbicas y paralímbicas. Este modelo es similar al propuesto por Alexander y colaboradores (1986), con la salvedad de que estos autores defendían la existencia de circuitos paralelos independientes dentro de cada territorio, mientras que, como ya se mencionó más arriba, la información de las regiones corticales asociativas, sensorimotoras y límbicas convergen en su territorio estriatal correspondiente.

Como se describió en el apartado anterior, las proyecciones corticoestriatales parecen estar relacionadas con la compartimentación química del estriado, de modo que los estriosomas son inervados por las cortezas prefrontal y límbica, mientras que la matriz recibe proyecciones desde las regiones sensorimotoras y asociativas de la corteza (Berendse y cols., 1992; Parthasarathy y cols., 1992; Flaherty y Graybiel, 1993). De esta manera, las proyecciones límbicas se extenderían por todo el estriado e interaccionarían

con todo tipo de conexiones aferentes. Además, en la rata se observó que las proyecciones recibidas en los estriosomas procedían de las capas infragranulares de la corteza cerebral, mientras que las que terminaban en la matriz se originaban en capas supragranulares (Arikuni y Kubota, 1986; Gerfen, 1989). Este hecho se ve apoyado por una mayor presencia de neuronas en las capas infragranulares de la allocorteza, considerada de naturaleza límbica, al contrario de lo que sucede en la neocorteza, en la que las capas supragranulares son las más densamente pobladas por neuronas (Parent y Hazrati, 1995). Según observaron Kincaid y Wilson (1996), la corteza somatosensorial parecía proyectar únicamente a la matriz y, con respecto al resto de regiones corticales, si bien las capas infragranulares proyectaban preferentemente a los estriosomas y las supragranulares lo hacían a la matriz, el patrón de inervación presentaba variaciones en algunos casos. Además, encontraron algunas fibras que atravesaban los distintos compartimentos. En este sentido, Graybiel también afirma que la proyección desde las regiones límbicas corticales no siempre terminan en los estriosomas, ya que observó algunas conexiones entre la corteza cingulada y la matriz (Graybiel, 1989). El significado de la compartimentación de las fibras corticoestriatales podría ser la comunicación entre distintas zonas corticales que proyectan a distintas (aunque próximas) zonas estriatales para establecer patrones de integración comunes.

Por último, como también se mencionó en apartados anteriores, la organización sináptica de las neuronas estriatales con respecto a las conexiones aferentes desde la corteza cerebral es altamente específica. Así, por ejemplo, las terminales corticales sobre las neuronas de proyección forman sinapsis asimétricas en la cabeza de las espinas y en la superficie de las propias dendritas distales (Hattori y cols., 1979; Bouyer y cols., 1984).

#### *1.4.2. Conexiones aferentes al estriado desde el tálamo*

El tálamo es la segunda fuente en cantidad de conexiones aferentes al estriado después de la corteza cerebral. Sin embargo, al contrario que ésta, el origen de las fibras no es tan amplio, sino que es específico de núcleos concretos. Los núcleos talámicos cuyas neuronas de proyección envían sus axones hacia el estriado dorsal son los siguientes: 1) región anterior del grupo ventral (ventral anterior, ventral lateral, y ventral medial); 2) núcleos intralaminares anteriores; 3) núcleos de la línea media; 4) núcleos intralaminares posteriores; 5) núcleo dorsomedial y 6) núcleos con una proyección



minoritaria, como el lateral posterior, pulvinar, grupo posterior, geniculado medial y *limitans* (de las Heras, 1997; de las Heras y cols., 1997; 1998b; de las Heras y cols., 1999; Mengual y cols., 1999; McFarland y Haber, 2001; Erro y cols., 2002).

La principal fuente talámica de proyecciones hacia el estriado dorsal parece ser el complejo de los núcleos intralaminares posteriores. En primates no humanos, el núcleo centromediano proyecta principalmente al estriado sensorimotor, formando bandas con una orientación oblicua (Sadikot y cols., 1992). Por el contrario, el núcleo parafascicular envía sus conexiones a territorios asociativos y límbicos, procediendo las primeras de la parte dorsal del núcleo, y las segundas de la zona ventral (Sadikot y cols., 1992). Recientemente, se ha llevado a cabo el estudio de las proyecciones desde estos núcleos talámicos hasta el estriado a nivel unicelular. Parent y Parent (2005) encontraron tres tipos distintos de neuronas de proyección en el complejo centromediano-parafascicular en función de su diana: aquéllas que proyectaban al estriado, aquéllas que proyectaban a la corteza, y aquéllas que proyectaban a ambas regiones. Los axones talamoestriatales parecían distribuirse como describieron previamente Sadikot y colaboradores (1992), dirigiéndose los del núcleo centromediano al putamen dorsolateral, y los del núcleo parafascicular a la cabeza del núcleo caudado. En cuanto a su distribución espacial, las arborizaciones dendríticas y axonales de las neuronas talámicas se extendían ampliamente en el plano sagital.

Otra fuente importante de proyecciones talamoestriatales son las procedentes de los núcleos ventral anterior y ventral lateral. Según describieron McFarland y Haber (2000), tanto estos núcleos talámicos como parte de la corteza cerebral proyectan a la misma región del estriado motor, participando en la ejecución del movimiento, el aprendizaje motor y la integración sensorimotora. Los axones proceden de neuronas situadas en la porción oral y caudal del núcleo ventral lateral, de la porción magnocelular y parvocelular del núcleo ventral anterior, y del área X de Olszewski, y terminan en una amplia extensión anteroposterior del estriado. Además, los núcleos ventral anterior y ventral lateral son los encargados de enviar la información desde los ganglios basales hasta las cortezas motora primaria, suplementaria, premotora, y la región motora de la cingulada.

En un trabajo posterior, los mismos autores encontraron que los axones de las neuronas de proyección situadas en la porción oral del núcleo ventral lateral terminaban en la zona dorsolateral del putamen postcomisural, que los de las neuronas situadas en

la porción parvocelular del núcleo ventral anterior llegaban a zonas más mediales y anteriores del putamen, y aquéllas de la porción magnocelular proyectaban a la región dorsal de la cabeza del núcleo caudado (McFarland y Haber, 2001). Pese a esta segregación, las terminaciones axónicas se solapaban mucho. Estos investigadores también encontraron que las terminales axónicas se distribuían en el estriado a modo de parches similares a los de las terminaciones corticoestriatales, aunque no aclaran si corresponden o no con la compartimentación química del estriado.

En cuanto a otras proyecciones talamoestriadas con menor representación, se ha visto que la parte lateral del núcleo romboidal proyecta a una larga extensión anteroposterior del núcleo caudado, mientras que la parte posterior del núcleo proyecta sólo al caudado posterior. Además, la parte dorsal del núcleo dorsomedial del gato envía sus axones a la zona anterior del núcleo caudado (de las Heras y cols., 1998b). Recientemente, se ha visto que los complejos lateral y posterior del tálamo del gato también proyectan tanto al núcleo caudado como al putamen (Avendaño y cols., 2005a).

En general, todas las terminales de las proyecciones talamoestriatales se organizan formando parches (Royce, 1978b; Beckstead, 1984; Takada y cols., 1985; de las Heras y cols., 1998a; 1998b; McFarland y Haber, 2001; Avendaño y cols., 2005a). En 1991, Ragsdale y Graybiel estudiaron la proyección de algunos núcleos talámicos sobre los distintos compartimentos químicos del estriado en el gato. Observaron que los núcleos paraventricular y romboidal proyectaban a los estriosomas, que los núcleos intralaminares rostrales y algunas zonas de los caudales inervaban a la matriz de forma difusa, y que el núcleo ventral anterior y el resto del complejo centromediano-parafascicular inervaban a zonas específicas de la matriz (Ragsdale y Graybiel, 1991). Además, con respecto a las proyecciones procedentes del complejo lateral y posterior, otros autores han demostrado que los parches con escasas terminales corresponden a los estriosomas pobres en acetilcolinesterasa (Avendaño y cols., 2005a).

Como se indicó previamente, las proyecciones talamoestriatales alcanzan tanto a las neuronas de proyección como a las interneuronas colinérgicas, nitrérgicas, y gabaérgicas con parvalbúmina (Lapper y Bolam, 1992; Kawaguchi y cols., 1995; Sidibe y Smith, 1999). Las terminales talámicas forman sinapsis asimétricas sobre las neuronas de proyección en la parte distal del árbol dendrítico, en ocasiones sobre las espinas, o más frecuentemente sobre la propia dendrita. En el caso de las interneuronas, establecen contactos sinápticos en toda su superficie. Es interesante observar el hecho de que, en

las neuronas de proyección, las terminales excitatorias (corticales y talámicas) se sitúan en la parte distal del árbol dendrítico, mientras que las inhibitorias y las moduladoras (desde la sustancia negra y las interneuronas) lo hagan próximas al soma. Esto sin duda facilita el papel regulador de las proyecciones aferentes dopaminérgicas y gabaérgicas sobre las glutamatérgicas.

#### *1.4.3. Conexiones aferentes al estriado desde la sustancia negra*

Las proyecciones nigroestriatales no son tan abundantes como las corticoestriatales o las talamoestriatales. Sin embargo, la capacidad moduladora de la dopamina hace que sean fundamentales en el control del funcionamiento de las neuronas de proyección del estriado. Al contrario que en las proyecciones mencionadas, los axones procedentes de la sustancia negra pueden inervar a una neurona estriatal que está recibiendo aferencias desde la corteza cerebral o el tálamo (Bouyer y cols., 1984; Freund y cols., 1984).

Las proyecciones de la sustancia negra sobre el estriado proceden de células dopaminérgicas situadas en la porción compacta de la sustancia negra, el área tegmental ventral, y el área retrorrubral (Hedreen y DeLong, 1991; Hontanilla y cols., 1996). En estos núcleos, existen dos tipos distintos de neuronas dopaminérgicas: las de la parte dorsal, que expresan también calbindina, y las de la parte ventral, que incluyen algunos cúmulos celulares en la porción reticulada de la sustancia negra y no expresan calbindina (Prensa y Parent, 2001). Aunque las sinapsis que forman son simétricas, la dopamina no actúa siempre como neurotransmisor inhibitorio, sino que su actuación es distinta según el tipo de receptor sobre el que actúe (Gerfen y cols., 1991). Como se ha explicado más arriba, en un principio se pensó que los distintos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> aparecían segregados en las neuronas de proyección, aunque posteriormente se comprobó que ambos podían convivir en la misma neurona (Aizman y cols., 2000).

Según el modelo aceptado antes del año 2001, las células de la zona dorsal de la porción compacta de la sustancia negra envían sus axones a la matriz, mientras que las de la zona ventral lo hacen a los estriosomas (Gerfen, 1992). Por medio de técnicas de trazado axónico unitario, Prensa y Parent (2001) corrigieron y completaron este modelo. Estos autores encontraron tres tipos distintos de neuronas de proyección nigroestriatales

en la parte dorsal de la porción compacta de la sustancia negra. El primer tipo, que englobaba a la mayoría de las proyecciones, tenía axones que terminaban en la matriz del estriado dorsal, de modo preciso en una determinada región, o bien en varias zonas matriciales discontinuas. El segundo tipo estaba formado por neuronas cuyo axón llegaba tanto a los estriosomas como a la matriz. El axón de las neuronas del tercer tipo terminaba en el estriado ventral y en los estriosomas, o bien en el estriado ventral y en la banda subcallosa. En cuanto a las neuronas situadas en la parte ventral de la porción compacta de la sustancia negra, estos autores observaron que principalmente inervaban los estriosomas, aunque algunos se ramificaban también en la matriz o en la banda subcallosa. Los axones de aquellas neuronas situadas en cúmulos dentro de la porción reticulada proyectaban tanto a la matriz como a la banda subcallosa.

A nivel celular, las terminales nigroestriatales contactan con neuronas de proyección e interneuronas colinérgicas, gabaérgicas y nitrérgicas formando, como se ha comentado, sinapsis simétricas (Kubota y cols., 1987a; Kubota y cols., 1987b; Pickel y cols., 1992; Kawaguchi y cols., 1995; Fujiyama y Masuko, 1996). El contacto con las interneuronas se produce en toda su superficie, mientras que en el caso de las neuronas de proyección la sinapsis se da en las espinas distales, principalmente en el cuello de las espinas en cuya cabeza se está recibiendo información cortical (Bouyer y cols., 1984; Freund y cols., 1984).

#### *1.4.4. Conexiones eferentes del estriado*

En contraposición a la gran diversidad de las proyecciones aferentes estriatales, sus neuronas de proyección envían los axones a núcleos muy concretos: hacia el globo pálido, tanto a su división lateral como a la medial, y hacia la sustancia negra. Sin embargo, pese a la concreción que manifiestan estas proyecciones, su estudio ha sido fuente de controversias, y recientemente ha sufrido un nuevo cambio que modifica la visión clásica que se tenía de ellas. Según el modelo clásico, las neuronas de proyección estriatales se dividían en dos grupos bien diferenciados: aquéllas que proyectaban al globo pálido medial y a la porción reticulada de la sustancia negra, y aquéllas que lo hacían al globo pálido lateral. Las primeras constituían la llamada *vía directa* de los ganglios basales, en la cual la información fluía desde el estriado a los núcleos de salida de los ganglios basales, y de allí al tálamo para volver a la corteza cerebral. Las neuronas de proyección del segundo grupo formaban la *vía indirecta*, en la que la

información pasaba por el globo pálido lateral y el núcleo subtalámico antes de llegar a los núcleos de salida (DeLong, 1990). Las neuronas de la vía directa se caracterizaban, además, por tener receptores de dopamina D<sub>1</sub> y expresar los péptidos sustancia P y/o dinorfina, y las de la vía indirecta por contar con receptores D<sub>2</sub> y expresar encefalina (Gerfen y cols., 1990; Wichmann y DeLong, 1996).

Este modelo ha sido ampliamente aceptado gracias a su significado funcional y su aplicación a ciertas situaciones fisiopatológicas, aunque han ido apareciendo resultados experimentales que ponen en entredicho su validez anatómica. Por ejemplo, se ha demostrado que los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> pueden estar localizados en la misma neurona de proyección (Aizman y cols., 2000), así como los péptidos encefalina, sustancia P y dinorfina (Penny y cols., 1986; Besson y cols., 1990; Anderson y Reiner, 1991; Wang y cols., 2006). Además, se ha observado en los roedores que alrededor del 64% de los axones de las neuronas de proyección estriatales terminan en varios núcleos distintos simultáneamente (Kawaguchi y cols., 1990; Wu y cols., 2000).

El modelo clásico también proponía que las proyecciones de los estriosomas llegaban únicamente a la porción compacta de la sustancia negra, mientras que las proyecciones estriadonigrales de la matriz terminaban en la porción reticulada (Gerfen y cols., 1985; Gerfen, 1992). Tokuno y colaboradores (2002) consiguieron demostrar en la rata que el modelo tampoco era exacto en este aspecto, ya que, a través de técnicas de degradación anterógrada, comprobaron que las proyecciones estriosomales llegaban a las dos porciones de la sustancia negra, al globo pálido, y al núcleo entopeduncular, equivalente del globo pálido medial de los primates.

Pero ha sido recientemente, por medio de un cuidadoso estudio anatómico del curso que siguen los axones de las neuronas de proyección estriatales, cuando se ha comprendido la gran complejidad de las conexiones eferentes del estriado. Lévesque y Parent (2005), empleando la técnica del trazado axónico unitario en el mono, reconstruyeron en su totalidad 27 axones que procedían de distintas regiones del estriado: de la matriz del núcleo caudado y del putamen, y del compartimento estriosomal del núcleo caudado. Además, contaron el número de terminales presentes en las fibras para comprobar a qué núcleos inervaban preferentemente las neuronas de proyección de las distintas regiones. El resultado global que ofreció el estudio fue que, de los 27 axones estudiados, 24 (el 90%) proyectaban al mismo tiempo a los dos segmentos del globo pálido y a la porción reticulada de la sustancia negra. Por regiones,

la gran mayoría de los axones de la matriz del núcleo caudado dejaban terminales sinápticas en los tres núcleos, y sólo 2 de 9 inervaban exclusivamente el globo pálido lateral. Además, dejaban un mayor número de terminales en la sustancia negra, con una distribución *en passant*. En cuanto a las neuronas de la matriz del putamen, presentaban una proyección y distribución similar a las del núcleo caudado, con una diferencia importante: había muchas más terminales en el globo pálido medial y lateral que en la porción reticulada de la sustancia negra. Todas las neuronas de proyección analizadas cuyo soma estaba situado en el interior de un estrioso del núcleo caudado enviaron sus axones a los tres núcleos receptores citados, apareciendo más terminales en la sustancia negra que en el globo pálido, como sucedía en la matriz de esta región estriatal. La diferencia fundamental era la distribución de las terminales en la sustancia negra, ya que formaban de 4 a 6 columnas que cruzaban dorsoventralmente la porción reticulada de este núcleo, y, aunque en un número bajo, alguna de ellas parecía llegar a la zona ventral de la porción compacta.

En resumen, este trabajo aporta tres conclusiones importantes para entender la salida de la información nerviosa del estriado: 1) aunque algunos axones estriatales proyectan sólo al globo pálido lateral, no hay ninguno que lo haga exclusivamente hacia el globo pálido medial y la porción reticulada de la sustancia negra, imposibilitando de esta manera la existencia anatómica de las vías directa e indirecta; 2) las neuronas de proyección situadas en los estriosomas no inervan directamente a la porción compacta de la sustancia negra, sino que llegan tanto a los dos segmentos del globo pálido como a la porción reticulada de la sustancia negra, pudiendo dejar finas colaterales en la porción compacta. Éste hecho corrobora las observaciones previas de Giménez-Amaya y Graybiel quienes, al inyectar trazadores retrógrados en los dos segmentos del globo pálido, encontraron neuronas marcadas en los estriosomas (Giménez-Amaya y Graybiel, 1991); 3) el núcleo caudado deja un gran número de terminales en la sustancia negra, y el putamen en el globo pálido; por lo tanto, la sustancia negra podría ser considerada un núcleo asociativo y el globo pálido, sensorimotor. Estos resultados confirmarían las observaciones de Wichmann y Kliem (2004), que proponen una participación preferente de la sustancia negra en procesos de memoria, atención, y preparación del movimiento, mientras que el globo pálido se implicaría en procesos motores más básicos.

En cualquier caso, es necesario buscar un vínculo entre el modelo funcional y el anatómico, ya que sin duda los dos son correctos. Es posible que éste se encuentre a

nivel bioquímico, y que las neuronas de proyección sean capaces de expresar encefalina en las colaterales del globo pálido lateral, y sustancia P en las de la sustancia negra y el globo pálido medial. Además, no se puede descartar el control bioquímico, por medio de receptores en los núcleos diana o incluso de autorreceptores, de la innervación preferente sobre unos u otros núcleos de los ganglios basales.

#### *1.4.5. Papel integrador de las interneuronas en el procesamiento de la información estriatal*

Como se ha ido viendo a lo largo de esta **Introducción**, las conexiones aferentes y eferentes del estriado forman una compleja organización modular, que se da principalmente a dos niveles anatómicos: topográfico, ya que los distintos territorios anteroposteriores del estriado podrían procesar de una forma diferente la información que accede al estriado (asociativa, sensorimotora o límbica); y químico, debido a que los dos compartimentos puestos de manifiesto por técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas (matriz y estriosomas) parecen tener diferentes relaciones hodológicas.

Una parte importante de la comunicación entre las diferentes áreas generadas por estos dos niveles organizativos es llevada a cabo por las interneuronas estriatales (Kawaguchi y cols., 1990; Aosaki y cols., 1994a; Aosaki y cols., 1995; Kawaguchi y cols., 1995; Koós y Tepper, 1999; Tepper y cols., 2004). La correcta integración de toda la información estriatal es imprescindible para la planificación y realización de los movimientos voluntarios, así como para su coordinación con los aspectos cognitivos y emotivos que llevan asociados (Kimura, 1990; Aosaki y cols., 1995; Koós y Tepper, 1999). Por otra parte, la actividad reguladora de las interneuronas sobre las neuronas de proyección estriatales es esencial. Por ejemplo, se ha visto que el bloqueo de los receptores de GABA tipo A aumenta la tasa de descarga de las neuronas de proyección en un 300%, causando alteraciones en el comportamiento motor (Nisenbaum y Berger, 1992), y que la eliminación de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas en el estriado del roedor conlleva un cambio en el patrón de activación de genes de expresión temprana en la matriz y los estriosomas, tras la aplicación de agonistas dopaminérgicos (Saka y cols., 2002). En contra de lo que se llegó a pensar, la regulación de las neuronas de proyección por parte de sus propias colaterales no parece tan importante (Jaeger y cols., 1994).

A pesar del bajo número de las interneuronas del estriado de la rata en comparación con las neuronas de proyección (5% frente a 95%), se ha visto que cada interneurona puede estar influyendo a, al menos, 100 neuronas de proyección, mientras que cada neurona espinosa estaría inervada por hasta 4 interneuronas diferentes (Koós y Tepper, 1999). Estos hallazgos demuestran por ellos mismos la compleja red que establecen las interneuronas estriatales para controlar a las neuronas de proyección. Teniendo en cuenta que la proporción entre las interneuronas y las neuronas de proyección en el primate es más equilibrada (25% frente a 75% aproximadamente en el hombre), el papel regulador de las interneuronas puede cobrar todavía una mayor importancia.

Como bien es sabido, las proyecciones dopaminérgicas que inervan el estriado regulan la actividad de las neuronas de proyección a través de los diversos receptores de dopamina que tienen estas células estriatales (Gerfen y cols., 1990; Aizman y cols., 2000). Además de este hecho, hay que tener en cuenta que la presencia de los receptores dopaminérgicos en las interneuronas proporciona a éstas un papel mediador entre la dopamina nigroestriatal y las proyecciones eferentes del estriado (Kemel y cols., 2002; Rivera y cols., 2002; Centonze y cols., 2003b; Pisani y cols., 2003).

En definitiva, los datos presentados en los párrafos precedentes apoyan el gran papel regulador e integrador de las interneuronas en el estriado humano. Por ello, esta Tesis Doctoral se centra en el análisis de la distribución y compartimentación de las interneuronas estriatales nitrérgicas, colinérgicas, e inmunorreactivas frente a calbindina en los distintos territorios del estriado, intentando dar respuesta con este estudio morfológico a la posible organización del procesamiento de la información sensorial, motora, cognitiva y límbica que se lleva a cabo en los ganglios basales.



## ***2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS***



A pesar del gran número de trabajos que se han centrado en las interneuronas estriatales, son muy pocos los que han llevado a cabo un análisis de su distribución en el estriado humano. Si se tiene en cuenta la gran extensión y complejidad del núcleo caudado y del putamen en el hombre, es lógico pensar que sus características químicas y celulares puedan cambiar a lo largo de toda su extensión anteroposterior, y más teniendo en cuenta la heterogeneidad química que caracteriza a estos núcleos de los ganglios basales.

Así pues, el propósito de este trabajo es analizar las interneuronas estriatales nitrérgicas, colinérgicas, y calbindina (CB) positivas en toda la extensión del núcleo caudado y del putamen, y observar la posible existencia de una organización particular con respecto al compartimento estriosomal. Para ello, ambos núcleos se dividieron en distintas regiones anatómicas, en cada una de las cuales se llevó a cabo el mismo análisis cualitativo y cuantitativo de esas tres poblaciones de interneuronas. Con el fin de completar este análisis topográfico, las regiones cuyo tamaño lo permitía fueron también divididas en los ejes dorsoventral y mediolateral. Para el estudio cuantitativo se emplearon técnicas estereológicas, ya que constituían la metodología más fiable para conocer la densidad neuronal en las distintas regiones estudiadas. En este sentido, debido a la diferencia de tamaño de estas regiones, resultaba más interesante conocer la densidad celular que el número total de células en cada región. Para el estudio de la organización compartimental de las interneuronas, se dibujaron numerosos estriosomas pertenecientes a las distintas regiones estriatales, y se marcó la posición de los somas en el centro y la periferia estriosomal, y en la matriz circundante.

Como se acaba de indicar, el estudio se centró en tres poblaciones distintas de interneuronas estriatales. Esta decisión se tomó para profundizar en el análisis de cada uno de los grupos, y valorar la importancia que tienen en la organización de los ganglios basales. Las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas fueron escogidas por ser consideradas las que mayor número de funciones realizan en el estriado. Después, el propósito era seleccionar uno de los grupos de interneuronas que expresan proteínas ligadoras de calcio y que son posiblemente gabaérgicas, escogiendo a las CB positivas por estar inmunohistoquímicamente mejor definidas que el resto, y atribuírseles una peculiar distribución en el estriado (Muiño y Prensa, 2004).

Para visualizar a las interneuronas nitrérgicas, se llevó a cabo la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa (NADPH-d), y las inmunohistoquímicas para la detección de la óxido nítrico sintasa (NOS) y somatostatina (SOM); para visualizar las colinérgicas, la técnica inmunohistoquímica para la detección de colina acetiltransferasa (ChAT); y, finalmente, se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas para la visualización de CB con el objetivo de detectar la última población seleccionada. Para el estudio del compartimento estriosomal, se empleó la técnica histoquímica de la acetilcolinesterasa (AChE), y las inmunohistoquímicas para la detección del neuropéptido encefalina (ENK), LAMP, CB, parvalbúmina (PV), y tirosina hidroxilasa (TH). Siempre que fue posible, estas técnicas se combinaron con las que permitían la detección de las interneuronas, para observar la distribución de las células con respecto al compartimento estriosomal en el mismo corte histológico.

De modo esquemático, los objetivos del presente estudio son los siguientes:

- 1) Análisis de la morfología, distribución, y relación con respecto al compartimento estriosomal de las interneuronas nitrérgicas.
- 2) Análisis de la morfología, distribución, y relación con respecto al compartimento estriosomal de las interneuronas colinérgicas.
- 3) Análisis de la morfología, distribución, y relación con respecto al compartimento estriosomal de las interneuronas CB positivas.
- 4) Comparación de la distribución topográfica y compartimental de los tres tipos de interneuronas analizados.

Estos cuatro objetivos requerían un estudio previo, que consistía en analizar la anatomía química del estriado humano en todo el eje anteroposterior, ya que algunas de las zonas más posteriores no habían sido estudiadas. El orden que se ha seguido para enumerar los objetivos y llevar a cabo el análisis tenía como fin dar una mayor importancia y profundidad al estudio de cada población interneuronal y a sus posibles funciones dentro del estriado, para después comparar los distintos grupos entre sí.

El propósito fundamental de este trabajo, es decir, el análisis de las interneuronas en el cerebro humano normal, pretende prolongarse con el estudio de estas interneuronas en cerebros de pacientes con enfermedades psiquiátricas o neurológicas. Con este gran objetivo en mente es fundamental poder disponer de

---

estudios fiables en toda la extensión del estriado humano normal. Ello podría ayudar a clarificar el papel de las interneuronas en estas enfermedades y ayudaría a orientar hacia nuevos posibles tratamientos terapéuticos.



### ***3. MATERIAL Y MÉTODOS***





### 3.1. Obtención y preparación del tejido humano

Las muestras biológicas humanas necesarias para este estudio, procedentes de personas sin alteraciones neurológicas o psiquiátricas, fueron obtenidas de tres fuentes distintas: el Banco de Tejidos Neurológicos de Navarra (Clínica Universitaria y Centro de Investigación Biomédica), el Departamento de Anatomía Patológica de la Clínica Universitaria de Navarra, y el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid. El protocolo ético fue aprobado por los comités responsables de las distintas instituciones conforme a la legislación vigente. Ninguna de las personas vinculadas al proyecto de investigación tuvo acceso al nombre o a la historia clínica del donante, y se estableció un código numérico con el patólogo correspondiente para conocer los datos necesarios en este estudio, que se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Datos clínicos de los casos empleados en este estudio**

Caso	Sexo	Edad (años)	Tiempo post mórtem (h)	Causa del fallecimiento
1	M	35	4	Ataque cardíaco
2	F	58	6	Hemorragia gastrointestinal
3	M	66	17	Adenocarcinoma gástrico
4	M	67	4,5	Neumonía bilateral
5	M	74	7	Sarcoma gástrico
6	M	63	12	Cáncer de próstata
7	F	20	2	Fibrosis quística
8	M	78	6	Cáncer de pulmón
9	M	50	6	Enfermedad pulmonar

*Abreviaturas. F, femenino; M, masculino*

#### 3.1.1. Recogida, preparación y fijación

Un hemisferio de cada cerebro fue recogido en la sala de autopsias, procurando que transcurriera el menor tiempo posible desde el fallecimiento del paciente hasta la inmersión del material en la solución de fijación. Antes de ser dividido, el cerebro completo fue pesado, y el patólogo determinó en cada caso la ausencia de signos anatómicos macroscópicos que evidenciaran una posible patología. Posteriormente, por

medio de un cerebrotomo, el cerebro fue dividido a través de la línea interhemisférica (Figura 1). El hemisferio cerebral fue totalmente sumergido en paraformaldehído al 4% (véase *Solución 1*) y, tras cerca de media hora, cuando el tejido se hubo endurecido lo suficiente, se procedió a la retirada de los restos de las meninges y de los vasos sanguíneos. Transcurridas unas 36 horas en paraformaldehído al 4% mantenido a 4 °C, se procedió a la división coronal del hemisferio cerebral en bloques de aproximadamente un centímetro de grosor, para facilitar la actuación del fijador y tener el material preparado para su corte (Figura 1). Además se talló cada uno de los bloques, conservando únicamente los ganglios basales y estructuras subcorticales relacionadas para que los cortes ulteriores pudieran montarse adecuadamente en portaobjetos (Figura 1).

Los bloques, convenientemente tallados, se volvieron a sumergir en paraformaldehído al 4% a 4 °C durante aproximadamente 10 días, dependiendo de cada caso, hasta que su consistencia fue lo suficientemente rígida al tacto. Esta solución se renovaba cada tres días. Cuando estuvieron fijados, los bloques se pasaron a una solución de sacarosa al 15%, renovándose también cada tres días, hasta que los bloques se hundieron hasta el fondo del recipiente. Finalmente, se transfirieron a una solución de sacarosa al 15% con azida de sodio, que actúa como fungicida (véase *Solución 2*).

***Solución 1*****Paraformaldehído al 4% con ácido pícrico**

<b>Finalidad</b>	Fijación del material biológico humano.
<b>Componentes</b>	Tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4); paraformaldehído; ácido pícrico.
<b>Preparación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elaboración del tampón fosfato: disolución en agua destilada de fosfato sódico monobásico (0,538%) y fosfato sódico dibásico (0,866%). Ajuste de pH hasta 7,4 con hidróxido de sodio.</li> <li>- Elaboración del paraformaldehído al 4%: disolución en agua destilada de la citada cantidad de esta sustancia. Calentar hasta 60 °C, añadir hidróxido de sodio hasta que el líquido sea transparente, y filtrar.</li> <li>- Mezcla de ambas soluciones y adición de un 0,2 % de ácido pícrico.</li> </ul>

**Solución 2****Sacarosa al 15% con azida de sodio**

<b>Finalidad</b>	Preparación del tejido para el corte en congelación y conservación a 4° C.
<b>Componentes</b>	Tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4); sacarosa; azida de sodio.
<b>Preparación</b>	- Elaboración del tampón fosfato (véase explicación en <i>Solución 1</i> ). - Adición de un 15% de sacarosa y un 0.1% de azida de sodio.

**3.1.2. Corte y almacenamiento**

Cuando los bloques estaban fijados y habían pasado al menos una semana en la solución de sacarosa, se procedió a cortarlos en un microtomo de congelación (Figura 1). Todos los cortes fueron realizados en el plano coronal y con un grosor de 50  $\mu$ m. A la hora de cortar, se prestó especial atención a la dirección del corte (de anterior a posterior o viceversa) y a la temperatura del microtomo, que habitualmente era -35 °C, aunque variaba según la dureza del bloque. Una vez obtenidos, los cortes se guardaron en placas de ELISA de 24 pocillos con solución crioprotectora (véase *Solución 3*), a razón de un corte por pocillo (Figura 1). De esta manera, el tejido podía almacenarse a -20 °C sin temor a que se congelara, y protegido del crecimiento de hongos. Cada corte se identificaba por el número de cerebro, el bloque al que pertenecía, y el número de placa de ELISA y pocillo en el que se encontraba.

**Solución 3****Solución de crioprotección**

<b>Finalidad</b>	Evitar la congelación de los cortes una vez almacenados a -20 °C.
<b>Componentes</b>	Tampón fosfato 0,05 M (pH 7,4); etilenglicol; glicerol.
<b>Preparación</b>	- Elaboración del tampón fosfato (véase explicación en <i>Solución 1</i> ) con la mitad de concentración. - Adición de un 30% de etilenglicol y un 30% de glicerol.

**3.2. Procesamiento del tejido**

Los cortes seleccionados para ser tratados con las distintas técnicas fueron lavados con el tampón correspondiente para eliminar los restos de la solución crioprotectora. Todas las técnicas se llevaron a cabo con los cortes de tejido en flotación. Los líquidos empleados como tampones fueron los siguientes: agua destilada

en la técnica histoquímica de la AChE; tampón fosfato 0.1 M a pH 7,4 para la técnica histoquímica de la NADPH-d (véase explicación en *Solución 1*); y tampón fosfato salino a pH 7,4 para las técnicas inmunohistoquímicas (véase *Solución 4*). Además de los líquidos mencionados, se emplearon otras soluciones para la incubación o revelado de los cortes de tejido, que serán explicadas en su momento.

**Solución 4****Tampón fosfato salino**

<b>Finalidad</b>	Aportar un ambiente adecuado en el que se desarrollen las técnicas inmunohistoquímicas.
<b>Componentes</b>	Tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4); cloruro sódico.
<b>Preparación</b>	- Elaboración del tampón fosfato (véase explicación en <i>Solución 1</i> ). - Adición de un 0,9% de cloruro sódico, y ajuste del pH a 7.4, si es necesario.

Con el objetivo de aclarar los métodos empleados para la visualización de las interneuronas y del compartimento estriosomal, a continuación se enumeran las técnicas empleadas según su tipo y finalidad.

**Tabla 2. Resumen de las técnicas empleadas para la visualización de las estructuras indicadas**

	Técnicas histoquímicas	Técnicas inmunohistoquímicas
Interneuronas nitrérgicas	NADPH-d	NOS, SOM, NeuN
Interneuronas colinérgicas		ChAT
Interneuronas con CB		CB
Compartimento estriosomal	AChE	ENK, LAMP, PV, CB, TH

*Abreviaturas. AChE, acetilcolinesterasa; CB, calbindina; ChAT, colina acetiltransferasa; ENK, encefalina; LAMP, proteína de membrana asociada al sistema límbico; NADPH-d, NADPH-diaforasa; NeuN, proteína nuclear neuronal; NOS, óxido nítrico sintasa neuronal; PV, parvalbúmina; SOM, somatostatina; TH, tirosina hidroxilasa. La proteína NeuN es un marcador de los núcleos neuronales. No es específico para el marcaje de las neuronas nitrérgicas, pero fue utilizado en relación a su estudio.*

### 3.2.1. Técnicas histoquímicas

El fundamento de las técnicas histoquímicas radica en la detección de una enzima basándose en su actividad (Figura 2). No se detecta si una determinada proteína está presente, sino más bien si esta proteína es activa. Por ello, se requiere que el tiempo post mórtem del material biológico sea el mínimo posible, y que la fijación sea óptima. Las muestras biológicas analizadas en este estudio cumplían los dos requisitos expuestos.

**AChE.** La AChE es la enzima encargada de la degradación de la acetilcolina, transformándola en colina y ácido acético. Su presencia es un buen indicador de la actividad colinérgica en el estriado, así como en otros núcleos (Graybiel y Ragsdale, 1978; Mesulam y cols., 1984). El método empleado en el presente estudio es una modificación del protocolo propuesto por Geneser-Jensen y Blackstad (1971), y consiste en la incubación de los cortes en una solución de acetilcolina, sulfato de cobre, glicina, y etopropacina. La acetilcolina es el sustrato de la enzima, lo cual va a desencadenar la reacción en el tejido, y la etopropacina es un inhibidor de colinesterasas inespecíficas. Una vez incubados los cortes el tiempo suficiente, se procedió al revelado de la actividad enzimática por medio de una solución de ferricianuro potásico. El desarrollo completo de esta técnica de detección enzimática fue el siguiente: después de ser seleccionados los cortes necesarios, se lavaron en agua destilada un mínimo de 30 minutos. Posteriormente, se situaron en la solución de incubación (véase *Solución 5*) durante un tiempo que osciló entre las 3 y las 5 horas. El modo de saber si la reacción había tenido efecto era observar el cambio del aspecto del tejido, ya que las zonas ricas en AChE con esta solución se vuelven opacas. Tras la incubación, los cortes fueron situados en la solución de revelado (véase *Solución 6*), donde permanecieron unos segundos hasta que adquirieron la coloración adecuada. Por último, los cortes volvieron a ser lavados con agua destilada y fueron montados y cubiertos como se explica en el apartado *Procedimientos comunes*.

Como control negativo, algunos cortes fueron incubados en las mismas condiciones, pero en ausencia de acetiltiocolina.

**Solución 5****Solución de incubación de la AChE**

<b>Finalidad</b>	Detectar la actividad enzimática de la AChE.
<b>Componentes</b>	Agua destilada; etopropazina; acetiltiocolina; glicina; sulfato de cobre; acetato sódico.
<b>Preparación</b>	- Adición de 0,023% de etopropazina, 0,1% de acetiltiocolina, 0,075% de glicina, 0,05% de sulfato de cobre, y 0,41% de acetato sódico. - Ajuste del pH a 5 añadiendo ácido acético glacial.

**Solución 6****Solución de revelado de la AChE**

<b>Finalidad</b>	Visualizar la actividad enzimática de la AChE.
<b>Componentes</b>	Agua destilada; ferricianuro potásico.
<b>Preparación</b>	- Adición de un 10% de ferricianuro potásico en agua destilada.

**NADPH-d.** A principios de la década de los noventa se demostró que esta enzima era idéntica a la denominada NOS (Dawson y cols., 1991; Hope y cols., 1991). Su función es la síntesis del gas óxido nítrico en el interior de las neuronas, el cual puede actuar fundamentalmente como relajante vascular o como neurotransmisor. La técnica empleada en el presente trabajo es una variación del protocolo descrito por Scherer-Singler y colaboradores (1983), y se basa en la reducción de una sal de tetrazolio y su posterior coloración. La idoneidad de esta técnica para revelar poblaciones de neuronas nitrérgicas ha sido demostrada con certeza (Scherer-Singler y cols., 1983; Ferrante y cols., 1987; Hussain y cols., 1996; Johannes y cols., 2003). En nuestro caso, el tampón empleado en la incubación es Tris 0,1 M a pH 8 con Tritón X-100 (véase explicación en *Solución 7*), y no es precisa ninguna reacción de revelado. Una vez seleccionados, los cortes fueron lavados durante al menos 30 minutos en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 (véase explicación en *Solución 1*). Después, fueron inmersos en la solución de incubación (véase *Solución 7*) durante un tiempo que osciló entre los 40 y los 75 minutos. Para saber si la reacción se había dado convenientemente, los cortes eran observados con frecuencia a partir de los 30 minutos de incubación. Una vez terminada ésta, volvieron a ser lavados en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 y montados y cubiertos según se explica en el apartado *Procedimientos comunes*.

**Solución 7****Solución de incubación de la NADPH-d**

<b>Finalidad</b>	Visualizar la actividad enzimática de la NADPH-d.
<b>Componentes</b>	Tampón Tris 0,1 M (pH 8) con Tritón X-100; $\beta$ -NADPH (Sigma); Nitroblue tetrazolium (Sigma).
<b>Preparación</b>	- Elaboración del tampón Tris: adición de un 1,2% de Trizma (Sigma) y 0,3% de Tritón X-100 en agua destilada. Ajuste de pH a 8. - Adición de un 0,083% de $\beta$ -NADPH, y un 0,065% de Nitroblue tetrazolium.

El Tritón X-100, que ha sido empleado en esta técnica y en todas las inmunohistoquímicas, es un detergente que aumenta la permeabilidad de las membranas, lo cual facilita la entrada de los reactivos y anticuerpos al interior de las neuronas. Como control negativo, algunos cortes fueron incubados sin  $\beta$ -NADPH.

### 3.2.2. Técnicas inmunohistoquímicas

El fundamento de estas técnicas consiste en la detección de la presencia de una determinada proteína, y no de su actividad. Para ello, se utilizan anticuerpos dirigidos frente a una cadena de aminoácidos específica de la proteína que se quiere detectar (Figura 2). Para evitar alteraciones en el anticuerpo y amplificar la señal de marcaje, las técnicas inmunohistoquímicas más empleadas son las indirectas, aquéllas en las que se añade un anticuerpo primario que se une a la proteína de interés, un anticuerpo secundario biotinilado que se une al primario, y unos complejos enzimáticos que se unen a las biotinas del secundario y a través de los cuales se visualiza la detección (Figura 2). Los complejos empleados en las técnicas descritas en este trabajo son los avidina-biotina-peroxidasa (ABC), según describieron Hsu y colaboradores (1981). Así, aunque el anticuerpo primario se una a la proteína que se quiere detectar en una proporción 1:1, los anticuerpos secundarios se unen al primario en gran número por medio de su cadena constante (Fc), y a través de sus biotinas también pueden unirse a muchos complejos ABC. Esto produce la amplificación de señal mencionada anteriormente. Una vez unidos todos los componentes, el revelado se produce aprovechando la actividad de la enzima peroxidasa de los complejos ABC, ya que la solución de revelado consta del sustrato de esta enzima (peróxido de hidrógeno), y un cromógeno que forma un precipitado marrón por la acción de la peroxidasa sobre su sustrato (Figura 2).

En este trabajo se realizaron técnicas inmunohistoquímicas frente a 9 proteínas diferentes, empleando un protocolo muy similar para todas ellas. Con el objetivo de facilitar la explicación del desarrollo de estas técnicas, la Tabla 3 muestra los anticuerpos empleados para la detección de las distintas proteínas. A continuación se detalla el protocolo general seguido en todas las técnicas inmunohistoquímicas.

**Tabla 3. Anticuerpos empleados en las técnicas inmunohistoquímicas para la detección de las distintas proteínas**

Anticuerpo Primario					Anticuerpo secundario			
	Animal	Fuente	Dilución	Tiempo de incubación	Animal	Fuente	Dilución	Tiempo de incubación
NOS	Conejo	Chemicon (22061298)	1:2000	1 noche	Cabra	Vector (BA1000)	1:250	90 min
SOM	Rata	Medicorp (002)	1:50	3 noches	Conejo	Vector (BA4000)	1:250	90 min
NeuN	Ratón	Chemicon (MAB377B)	1:100	1 noche	Caballo	Vector (BA2000)	1:250	90 min
ChAT	Cabra	Chemicon (AB144P)	1:400	2 noches	Conejo	Vector (BA5000)	1:250	90 min
CB	Ratón	Sigma (C9848)	1:2500	1 noche	Caballo	Vector (BA2000)	1:250	90 min
ENK	Ratón	Medicorp (1018)	1:50	2 noches	Caballo	Vector (BA2000)	1:250	90 min
LAMP	Ratón	Dr. Levitt	1:1500	2 noches	Caballo	Vector (BA2000)	1:250	90 min
PV	Ratón	Sigma (PARV-19)	1:2500	1 noche	Caballo	Vector (BA2000)	1:250	90 min
TH	Ratón	Incstar (22941)	1:250	2 noches	Caballo	Vector (BA2000)	1:250	90 min

*Véase la Tabla 2 para identificar las abreviaturas. En la columna Fuente se indica entre paréntesis el número de lote o de catálogo de los anticuerpos. La presentación de estos datos se realiza acorde con las directrices de la revista The Journal of Comparative Neurology [494:1-6 (2006)]*

El desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas contó con cinco pasos fundamentales: a) inactivación de la peroxidasa endógena; b) incubación en el anticuerpo primario; c) incubación en el anticuerpo secundario; d) incubación en los



complejos ABC; y, e) revelado. El primer paso es fundamental para evitar marcaje inespecífico en el revelado, ya que en el cerebro humano, como en otros tejidos, existe peroxidasa endógena que puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno del revelado, y producir la precipitación del cromógeno (Ambani y Van Woert, 1973).

Una vez seleccionados los cortes, se lavaron durante al menos 30 minutos en tampón fosfato salino (véase *Solución 4*), y se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena situándolos en la *Solución 8* durante 30 minutos. Después, se volvieron a lavar con el mismo tampón durante un tiempo similar, procurando eliminar las burbujas aparecidas durante la inactivación. Posteriormente, se procedió a la incubación en el anticuerpo primario, según las condiciones citadas en la Tabla 3. Todas las soluciones de incubación del anticuerpo primario llevaban Tritón X-100 y un suero normal del animal en el que se obtuvo el anticuerpo secundario (véase *Solución 9*). El propósito del suero normal es evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, y tiene que ser del mismo animal que el anticuerpo secundario para evitar que éste reaccione contra él. Tras esta incubación, los cortes volvieron a lavarse y fueron incubados en la solución del anticuerpo secundario (véase *Solución 10*). Antes de situar los cortes en la solución de los complejos ABC (véase *Solución 11*), fueron de nuevo lavados en el mismo tampón. Sin embargo, tras retirar los complejos ABC y realizar dos lavados en tampón fosfato salino, los cortes fueron sometidos a un lavado con el tampón de revelado, Tris HCl 0,05 M (pH 7,6) (véase explicación en *Solución 12*). Finalmente, los cortes fueron situados en la reacción de revelado (véase *Solución 12*) durante un tiempo variable según fueran adquiriendo el marcaje y, tras detener la reacción en el tampón de revelado, volvieron a ser lavados durante 30 minutos en tampón fosfato salino. Tras ello, estaban preparados para ser montados y cubiertos como se explica en el apartado *Procedimientos comunes*.

***Solución 8*****Solución de inactivación de la peroxidasa endógena**

<b>Finalidad</b>	Inactivar por saturación la peroxidasa existente en el tejido.
<b>Componentes</b>	Agua destilada; etanol; peróxido de hidrógeno.
<b>Preparación</b>	- Preparar solución de peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada. - Mezclar solución anterior (2:3) con otra de etanol al 50% (1:3).

**Solución 9****Solución del anticuerpo primario**

<b>Finalidad</b>	Conseguir la unión del anticuerpo primario a la molécula que se quiere detectar.
<b>Componentes</b>	Tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4; Tritón X-100; suero normal; anticuerpo primario.
<b>Preparación</b>	- Añadir en el tampón la cantidad de anticuerpo primario indicada en la Tabla 3, el suero normal correspondiente al 2% y Tritón X-100 al 0,1%.

**Solución 10****Solución del anticuerpo secundario**

<b>Finalidad</b>	Conseguir la unión del anticuerpo secundario al primario.
<b>Componentes</b>	Tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4; Tritón X-100; suero normal; anticuerpo secundario.
<b>Preparación</b>	- Añadir en el tampón el anticuerpo secundario correspondiente a 1:250, el suero normal al 2% y Tritón X-100 al 0,1%.

**Solución 11****Solución de los complejos avidina-biotina-peroxidasa**

<b>Finalidad</b>	Conseguir la unión de los complejos ABC al anticuerpo secundario para su detección.
<b>Componentes</b>	Tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4; ABC (Vector).
<b>Preparación</b>	- Añadir en el tampón los reactivos A y B a dilución 1:125. La solución debe ser preparada al menos 30 minutos antes de ser utilizada.

**Solución 12****Solución de revelado de las técnicas inmunohistoquímicas**

<b>Finalidad</b>	Visualizar el complejo anticuerpo primario-anticuerpo secundario-ABC, y así la proteína de interés.
<b>Componentes</b>	Tampón Tris HCl 0,05 M (pH 7,6); diaminobenzidina (DAB) (Sigma); peróxido de hidrógeno.
<b>Preparación</b>	- Elaboración del tampón Tris: adición de un 0,6% de Trizma (Sigma) en agua destilada. Ajuste de pH a 7,6. - Adición de 0,05% de DAB y filtrado. - Adición de un 0,003% de peróxido de hidrógeno.

El protocolo citado fue llevado a cabo en todas las técnicas inmunohistoquímicas, salvo en la detección de LAMP, en la que, al ser una proteína de membrana, el Tritón empleado fue menor (0,005% en la solución del anticuerpo

primario, y 0,0025% en la del anticuerpo secundario). Como control negativo, algunos cortes fueron incubados sin el anticuerpo primario.

### 3.2.3. Técnicas de doble marcaje

Con el fin de observar dos tipos diferentes de marcaje en la misma preparación, algunos cortes fueron tratados combinando técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas o dos técnicas inmunohistoquímicas distintas. Para confirmar si la presencia de unos pequeños cuerpos encontrados con los marcadores de neuronas nitrérgicas eran realmente neuronas o se trataba de grandes varicosidades, se llevó a cabo una doble técnica inmunohistoquímica frente a la NOS y la proteína nuclear neuronal (NeuN). La primera tiñe a las neuronas nitrérgicas, y la segunda marca el núcleo de todo tipo de neuronas. En el resto de casos, las técnicas dobles se llevaron a cabo para visualizar en la misma preparación una población de interneuronas y el compartimento estriosomal. Para ello se realizaron las siguientes técnicas combinadas de doble marcaje: 1) histoquímica de la NADPH-d con inmunohistoquímica de la ENK; 2) inmunohistoquímica de la ChAT con la de la ENK. En el caso de las interneuronas CB positivas, no se llevó a cabo ninguna técnica doble con ENK al estar los dos anticuerpos generados en el mismo animal, y esperar reacciones cruzadas. En este caso se emplearon cortes adyacentes teñidos para la CB y la ENK para realizar el estudio. Dicho método es muy utilizado en esta clase de análisis.

A continuación, se explica brevemente el protocolo seguido en este tipo de técnicas.

**Técnica doble de la NADPH-d y la ENK.** En este caso, al tratarse de dos técnicas distintas, no hubo que plantearse ningún problema con respecto a las reacciones cruzadas entre los anticuerpos. Así, se llevó a cabo en primer lugar la técnica de la NADPH-d como se ha explicado en el apartado correspondiente, procurando obtener un marcaje suficiente pero sin fondo inespecífico. Después, se lavaron los cortes durante al menos 2 horas en tampón fosfato salino, y se procedió con la técnica inmunohistoquímica como se ha señalado también con anterioridad. En el momento del revelado, la reacción se detuvo en cuanto empezaron a distinguirse estriomas; de esta manera se intentó no enmascarar la presencia de las interneuronas nitrérgicas.

**Técnica doble de la NOS y la NeuN.** Como queda explicado en la Tabla 3, el anticuerpo frente a NOS está elaborado en conejo, mientras que el empleado frente a NeuN está obtenido en ratón. Por ello, no hubo problema de reacciones cruzadas entre ambos. Como suero normal se empleó seroalbúmina bovina, que puede bloquear los sitios de unión inespecíficos sin reaccionar con ninguno de los cuatro anticuerpos empleados en el estudio. El protocolo fue similar al explicado para las técnicas individuales. En la solución del anticuerpo primario se añadió un cóctel de los dos anticuerpos a las concentraciones indicadas, y con seroalbúmina bovina al 2%. Tanto el tampón fosfato salino como el Tritón X-100 fueron empleados de la misma manera. Posteriormente, se procedió a la incubación del anticuerpo secundario correspondiente al NeuN en las mismas condiciones que se ha citado, y se reveló después con un protocolo ligeramente modificado con respecto al estándar, que incluye níquel, según se recoge en la *Solución 13*. Gracias a esta metodología, los núcleos neuronales podían visualizarse en color negro o grisáceo, y se contrastaban con las células nitrérgicas, que posteriormente serían reveladas con el color marrón habitual de la DAB. Tras abundantes lavados en tampón fosfato salino, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente a la técnica de la NOS, y se reveló con el protocolo de la DAB descrito anteriormente.

**Solución 13****Solución de revelado inmunohistoquímico con níquel-DAB**

<b>Finalidad</b>	Visualizar el complejo anticuerpo primario-anticuerpo secundario-ABC con un color distinto del marrón habitual.
<b>Componentes</b>	Tampón Tris HCl 0,05 M (pH 7,6); DAB (Sigma); peróxido de hidrógeno; sulfato de níquel (Sigma).
<b>Preparación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elaboración del tampón Tris según se ha explicado en la <i>Solución 12</i>.</li> <li>- Adición de 0,295% de sulfato de níquel y filtrado.</li> <li>- Adición de 0,024% de DAB y filtrado.</li> <li>- Adición de un 0,003% de peróxido de hidrógeno.</li> </ul>

Como controles negativos, se incubaron algunos cortes sin el anticuerpo primario frente a la NeuN, y otros sin el correspondiente a la NOS.

**Técnica doble de la ENK y la ChAT.** El objetivo de esta técnica era la visualización en el mismo corte de las interneuronas colinérgicas y el compartimento

estriosomal. Para ello, se procedió de un modo similar a como se ha explicado en la técnica doble anterior. Se incubaron los cortes en una solución de tampón fosfato salino con Tritón X-100, seroalbúmina bovina, y el anticuerpo frente a la ENK y la ChAT. En este caso, se empleó la técnica de la DAB para obtener un color marrón sobre las neuronas. Una vez lavados los cortes, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario y el revelado de la ENK, que se realizó con la técnica del níquel-DAB, observándose los estriosomas de color grisáceo. Como se ha descrito en el punto anterior, como controles negativos se incubaron algunos cortes sin el anticuerpo primario frente a la ChAT, y otros sin el anticuerpo frente a la ENK.

#### 3.2.4. Procedimientos comunes

Una vez terminadas las técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas o dobles, se procedió a montar, deshidratar, desengrasar y cubrir los cortes, todos bajo el mismo protocolo. En primer lugar, los cortes fueron montados en tampón fosfato tres veces diluido (véase la explicación en *Solución 1*). Los portaobjetos empleados tenían unas dimensiones de 50 por 70 mm, y todos los cortes fueron montados con la misma orientación (dorsal arriba, medial a la derecha) para facilitar el estudio de los cortes adyacentes. Los portaobjetos habían sido previamente gelatinizados para favorecer la adherencia del tejido.

Después de ser montados, los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente durante un mínimo de una noche, y fueron deshidratados en alcoholes de concentración creciente. En primer lugar, estuvieron 1 minuto en una cubeta con agua destilada para retirar el polvo que pudieran haber adquirido, y después estuvieron 3 minutos en cada una de las cubetas con alcohol etílico al 70%, 80%, 95% y 100%, repitiendo en otra con esta última concentración.

Para desengrasar las preparaciones, se emplearon dos protocolos distintos, aunque muy similares. En uno de ellos, el líquido empleado fue tolueno, en el cual los cortes fueron sometidos a dos pases de 10 minutos cada uno. En el otro protocolo se empleó xilol, en donde se realizaron seis pases de 10 minutos cada uno.

Por último, los cortes fueron cubiertos con DePeX<sup>®</sup>, empleando cubreobjetos de 50 por 60 mm, y fueron dejados durante al menos 48 horas a temperatura ambiente antes de proceder con su análisis.

### 3.3. *Análisis de los datos*

Parte del análisis que va a ser explicado a continuación fue llevado a cabo antes de realizar las técnicas de marcaje del tejido, como por ejemplo la división del estriado o la selección sistemática con inicio al azar de los cortes. Esta última se menciona en el tercer apartado de esta sección, relativa a los métodos de medida de la distribución neuronal.

En general, una vez teñidos, los cortes se estudiaron de dos maneras distintas. Por una parte, se procedió al estudio de la morfología neuronal y la relación entre las neuronas y el compartimento estriosomal por medio de una cámara clara acoplada a un microscopio; por otra, se llevó a cabo el análisis estereológico para el estudio de la densidad neuronal.

#### 3.3.1. *División topográfica del estriado*

Para llevar a cabo un estudio lo más completo posible de toda la extensión del núcleo caudado y del putamen, se procedió a su división en regiones tomando en cuenta marcadores topográficos convencionales del estriado o estructuras relacionadas (Figura 3). Esta división se realizó tras el estudio de tres conocidos atlas del cerebro humano: Schaltenbrand y Wahren (1977), Mai y colaboradores (1997), y Nowinski y colaboradores (1997).

En primer lugar, y como se describe en el primer apartado de la **Introducción**, se tomó como referencia la comisura anterior, que permitió dividir al núcleo caudado y al putamen en regiones precomisurales y postcomisurales (Figura 3). Teniendo en cuenta esta primera división, en el núcleo caudado pueden diferenciarse cinco regiones, que ordenadas de anterior a posterior son las siguientes: 1) cabeza precomisural; 2) cabeza postcomisural; 3) cuerpo; 4) cola y 5) giro. La cabeza precomisural abarca desde el comienzo del núcleo hasta la aparición de la comisura anterior, y es la región más voluminosa del núcleo caudado. A partir de este punto, se encuentra la cabeza postcomisural, que concluirá en aquel nivel en el que los cuerpos mamilares hipotalámicos desaparecen. Algunos autores sustituyen este punto de referencia por el agujero interventricular, situado ligeramente más anterior. En cualquier caso, en torno a este nivel anatómico aparece un pronunciado estrechamiento de la cabeza del núcleo caudado, que es considerado el comienzo de la siguiente región, el cuerpo del núcleo

caudado. Acompañando al ventrículo lateral en su recorrido, el cuerpo se dobla en dirección ventral y pasa a formar el giro del núcleo caudado, que tras un breve discurrir en dirección ventral vuelve a girar hacia territorios anteriores y forma la cola de dicho núcleo estriado, que se ubica en la pared lateral y dorsal del asta inferior del ventrículo lateral. En el caso del putamen, sólo caben distinguir sus regiones precomisural y postcomisural en el eje anteroposterior (Figura 3). Debido a su complejidad y a sus particulares características anatómicas y funcionales que le diferencian del resto del estriado, el núcleo *accumbens* fue descartado de nuestro estudio (Prensa y cols., 2003). Para llevar a cabo su delimitación, se empleó el método convencional que proponen Selden y colaboradores (1994b).

En resumen, el estriado fue dividido en siete regiones distintas en el eje anteroposterior: 1) cabeza precomisural; 2) cabeza postcomisural; 3) cuerpo; 4) giro; y 5) cola del núcleo caudado; 6) putamen precomisural; y 7) putamen postcomisural (Figura 3).

Además de la división del estriado en el eje anteroposterior, cada corte perteneciente a una de estas regiones fue dividido en el eje dorsoventral y mediolateral (Figura 4). El objetivo de esta nueva división fue realizar el análisis estereológico de la densidad neuronal en los distintos sectores, y así poder observar la heterogeneidad dentro de cada región. Sólo se dividieron aquellas regiones con un área lo suficientemente grande como para que la división no afectara al estudio estereológico (véase el primer apartado de la **Discusión** para profundizar acerca de este tema). Así, la cabeza precomisural y postcomisural del núcleo caudado y toda la extensión del putamen fueron divididos en cuatro sectores: dorsomedial, ventromedial, dorsolateral, y ventrolateral. El giro del núcleo caudado fue dividido en el eje dorsoventral, obteniéndose así un sector dorsal y otro ventral (Figura 4). Todas estas divisiones fueron equitativas, dejando una mitad dorsal y otra ventral, una medial y otra lateral. El cuerpo y la cola del núcleo caudado no sufrieron ningún tipo de división. Además, en cuanto a la división del estriado en el eje dorsoventral merece la pena destacar el polo ventral del putamen postcomisural, llamado por algunos autores putamen posteroventral (Fudge y Haber, 2002) (Figura 3). Éste parece fundirse con la amígdala y la cola del núcleo caudado, aunque por medio de técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas su distinción es posible (en el apartado 5.2 de la **Discusión** se profundiza acerca de este tema).

### *3.3.2. Métodos para la caracterización morfológica de las interneuronas, del compartimento estriosomal, y de la relación entre ambos*

El estudio de la morfología de las interneuronas y de los estriosomas, así como la relación entre ambos, fue llevado a cabo por métodos macroscópicos y, principalmente, microscópicos. Los métodos macroscópicos fueron destinados al estudio de la compartimentación química estriatal especialmente en el estriado posterior, donde los datos existentes no eran suficientemente claros. Además, se quisieron confirmar los datos publicados sobre la heterogeneidad química estriatal de las regiones anteriores del estriado con los distintos marcadores histoquímicos e inmunohistoquímicos (Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1999; Fudge y Haber, 2002). Para ello, se realizaron impresiones directas de algunas preparaciones con una ampliadora Focomat V35 (Leitz) sobre papel fotográfico del número 4 o 5. El tiempo de exposición varió según la intensidad del marcaje que se quería ilustrar. Por medio de este método, se obtuvo una fotografía en negativo de la preparación, de modo que las regiones con ausencia de marcaje se veían más oscuras que aquéllas intensamente teñidas. Una vez reveladas, las fotografías fueron digitalizadas en un escáner Scanjet 7400c (Hewlett Packard), y tratadas con los programas Photoshop (Adobe Systems, San José, California, EE UU) y Canvas (Deneba Systems, Miami, Florida, EE UU).

La relación entre las interneuronas y el compartimento estriosomal se analizó por medio de una cámara clara asociada a un microscopio Nikon Eclipse 80i (Melville, Nueva York, EE UU) y a una lupa Nikon SMZ1500. Además, tanto el microscopio como la lupa contaban con una cámara digital Nikon DXM1200, gracias a la cual se tomaron las fotografías que se ilustran en este trabajo. En aquellas preparaciones cuyo doble marcaje ilustraba tanto el compartimento estriosomal como una determinada población de interneuronas, se procedió a realizar dibujos por medio de la cámara clara del contorno estriosomal, tanto de su centro como de su periferia, generalmente a 4 o 10 aumentos. La posición de las interneuronas fue punteada de la misma manera, aunque su presencia y morfología se confirmó a aumentos superiores (20 o 40). Estos dibujos se escanearon a 300 píxeles por pulgada, y fueron tratados con los programas citados anteriormente.

En el caso de las interneuronas CB positivas, su distribución con respecto al compartimento estriosomal se analizó por medio de cortes adyacentes. Se ha observado



que los límites estriosomales no sufren una gran variación en una distancia de 50  $\mu\text{m}$  en el eje anteroposterior (Holt y cols., 1996; Jakab y cols., 1996; Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1998). Por ello, el compartimento estriosomal fue dibujado a 10 aumentos en la preparación teñida con la técnica inmunohistoquímica de la ENK y, posteriormente, ayudándose de la presencia de vasos sanguíneos, se señaló la presencia de las interneuronas dentro de los estriosomas y en las proximidades de los mismos. Además, la presencia del compartimento estriosomal podía distinguirse en la preparación revelada para la visualización de la CB, si bien no con la misma definición que en la de ENK.

Con respecto al estudio de la morfología neuronal, varias interneuronas de las tres poblaciones estudiadas fueron dibujadas por medio de la cámara clara con el objetivo de 100 aumentos. Además, fueron fotografiadas con la cámara digital acoplada al microscopio. Los dibujos fueron escaneados y tratados como se ha descrito previamente. Para obtener datos numéricos que describieran de algún modo la morfología neuronal, se midió el volumen del soma de algunas interneuronas en las distintas regiones del estriado previamente descritas. Este estudio se llevó a cabo especialmente en las interneuronas colinérgicas y CB positivas, ya que en las interneuronas nitrérgicas el estudio morfológico se centró en la clasificación en tres grupos distintos en virtud de sus características somatodendríticas. La medida del volumen neuronal se realizó por medio del *nucleator*, una técnica estereológica que calcula el volumen de la célula por la proyección aleatoria de dos planos que cortan el soma de la neurona. La medida se realizó en neuronas seleccionadas al azar con la técnica del disector óptico, que se explica con detalle en el apartado siguiente.

Los modelos tridimensionales presentados en este trabajo se elaboraron con IMOD, un programa informático gratuito elaborado y distribuido por el *Boulder Laboratory for 3-Dimensional Electron Microscopy of Cells* de la Universidad de Colorado en Estados Unidos (<http://bio3d.colorado.edu/imod/index.html>).

### 3.3.3. Métodos para el estudio de la distribución neuronal

Como parámetro numérico para estudiar la distribución de las interneuronas en el estriado se escogió la densidad neuronal, esto es, el número de neuronas por unidad de volumen ( $\text{mm}^3$ ). Debido a las diferencias de tamaño entre las distintas regiones

estriatales que fueron estudiadas, interesaba más obtener este parámetro relativo que el número total de neuronas. Para llegar a conocer este dato se empleó la técnica estereológica del disector óptico (Bjuggn y Gundersen, 1993; Wreford, 1995; Mayhew y Gundersen, 1996; Martin y cols., 2000).

En primer lugar, se aplicó una fracción de muestreo constante para seleccionar los cortes de cada región de un modo sistemático con inicio al azar, para después ser tratados con las técnicas de visualización de las distintas poblaciones de interneuronas. De hecho, de esta manera fueron seleccionados los cortes que iban a ser tratados con la técnica histoquímica de la NADPH-d, mientras que aquéllos en los que se realizaría el estudio de las interneuronas colinérgicas e inmunorreactivas frente a CB eran adyacentes al primero. Después, cada corte se dividió en los ejes dorsoventral y mediolateral por medio de una regla y un rotulador de punta fina, y fueron analizados con un microscopio Olympus (Olympus Europe, Hamburgo, Alemania), que contaba con una platina motorizada y que estaba conectado a un ordenador Dell OptiPlex por medio de una videocámara (JVC TK-C1380). El sistema informático empleado para aplicar el método del disector óptico fue CAST (Visiofarm, Hørsholm, Dinamarca y Olympus España). Una vez seleccionado el sector estriatal objeto de estudio, el programa informático creó una cuadrícula formada por disectores con orientación al azar y con unos parámetros determinados (Figura 4). En cada uno de esos cuadros se contó el número de interneuronas presentes en todo el grosor del corte, que fue medido por medio de un *microcator* (Heidenhain VZR401, Traureut, Alemania).

La fórmula por la cual se calcula la densidad neuronal es la siguiente:

$N_v = \Sigma Q_d^- / \Sigma V_{dis}$  (neuronas / mm<sup>3</sup>), donde:

- $N_v$  es la expresión de la densidad neuronal.
- $\Sigma Q_d^-$  es la suma de las neuronas encontradas en todos los disectores en los que fue dividido cada sector.
- $\Sigma V_{dis}$  es el volumen de todos los disectores, que se obtiene al multiplicar el número de disectores por el área de un disector, y por la profundidad del corte.

Los parámetros de la cuadrícula creada por el programa informático fueron diferentes para cada una de las poblaciones neuronales estudiadas, aunque bajo ningún

concepto se alteraron en el estudio dentro de cada población. Así, las interneuronas nitrérgicas fueron estudiadas con una fracción de muestreo del disector de aproximadamente 1%, y un área de cada disector de  $7490 \mu\text{m}^2$ . Las interneuronas colinérgicas fueron contadas con una fracción de 3,25%, y un área de cuadro de  $29285 \mu\text{m}^2$ , y en el caso de las interneuronas CB positivas el área del disector era la misma, pero la fracción ascendió hasta el 10%. El motivo de la diferencia en el área del disector fue que las neuronas nitrérgicas fueron medidas a 40 aumentos para distinguir su morfología, mientras que las colinérgicas y las CB positivas fueron contadas a 20. Es preciso señalar que en el caso de las CB positivas se decidió subir la fracción de muestreo del disector hasta el 10% debido a que estudios previos habían descrito una presencia mucho menor de estas neuronas en el estriado (Prensa y cols., 1998; Cicchetti y cols., 2000; Muiño y Prensa, 2004), así que se optó por contar un mayor número de disectores.

La unidad de recuento seleccionada para llevar a cabo el análisis fue el soma neuronal, ante la imposibilidad de distinguir en los cortes los nucleolos o el núcleo de las interneuronas por presencia o ausencia de marcaje. Así pues, se contaron aquellas neuronas cuyo soma quedaba dentro del volumen del disector, según la convención de Sterio, que nos llevó a incluir en el estudio las neuronas que aparecían en el plano focal superior, y desaparecían en el inferior (Sterio, 1984). A la hora de realizar el recuento, el disector queda delimitado en pantalla por un cuadro con dos lados rojos y dos lados verdes (Figura 4). Si el soma de la neurona quedaba en contacto con cualquiera de los lados verdes, era incluida en el recuento. Si estaba dentro del disector sin contactar con ningún borde, también era incluida. Si, por el contrario, estaba dentro o fuera del disector pero rozaba alguno de los lados rojos, no era contabilizada (Figura 4).

Una vez obtenidos, los datos de la densidad neuronal fueron analizados con el programa informático SPSS (SPSS Inc., Illinois, EE UU), para conocer los parámetros estadísticos básicos [media, varianza, coeficiente de variación, error estándar de la media (SEM), normalidad, asimetría y curtosis] de los datos de cada sector o región estriatal. Además, se utilizó este programa para analizar las diferencias entre las distintas regiones o sectores. En concreto, se empleó la prueba estadística *ANOVA* con *Tamhane* y *Tukey B* como análisis a posteriori para comparar más de dos muestras. La prueba *t* de *Student* se empleó para comparar dos muestras por vía paramétrica, y *U* de *Mann-Whitney* para hacerlo por vía no paramétrica. A la hora de interpretar los

resultados de estas pruebas estadísticas, se consideró que una probabilidad comprendida entre los valores 0,05 y 0,01 expresaba diferencias significativas, mientras que si la probabilidad era inferior al 0,01, expresaba diferencias muy significativas (en el apartado 5.1.3 de la **Discusión** se profundiza acerca de este tema).

Para ilustrar la distribución neuronal, se tomaron algunos cortes como ejemplo de la posición de las distintas poblaciones de interneuronas en una determinada región del estriado. En el caso de las interneuronas nitrérgicas, la ilustración se realizó por medio de la cámara clara acoplada al microscopio. La presencia de las interneuronas fue dibujándose campo por campo en varias láminas de papel de tamaño DIN A3, que fueron escaneadas y ensambladas por medio del programa informático Canvas para mostrar la distribución en la totalidad del corte. El contorno del estriado y la posición de las interneuronas fueron digitalizados también por medio del mismo programa. Sin embargo, en el caso de las interneuronas colinérgicas y CB positivas, se optó por emplear el sistema informático Neurolucida (Microbrightfield Europe, Magdeburgo, Alemania) para ilustrar su distribución. En este caso, el dibujo se realizaba directamente en el ordenador, gracias a que este sistema conecta microscopio y ordenador a través de una videocámara y permite dibujar directamente sobre la preparación proyectada.

**FIGURA 1**

**Figura 1. Preparación del material biológico humano.** Fotografías que ilustran algunos de los pasos que se siguieron en la preparación del material biológico humano, tal y como se describe en el apartado *Material y Métodos*. Uno de los hemisferios cerebrales es recogido en el momento de la autopsia (**A** y **B**) e incluido en el fijador. Posteriormente, se divide en bloques de entre 0,5 y 1 cm de grosor (**C**), que son tallados para adecuar su tamaño al de los portaobjetos (**D**). Una vez fijados, los bloques se cortan en el microtomo de congelación (**E**), y cada una de las secciones se recoge con un pincel (**F**) y se sitúa en la solución crioprotectora (**G**).



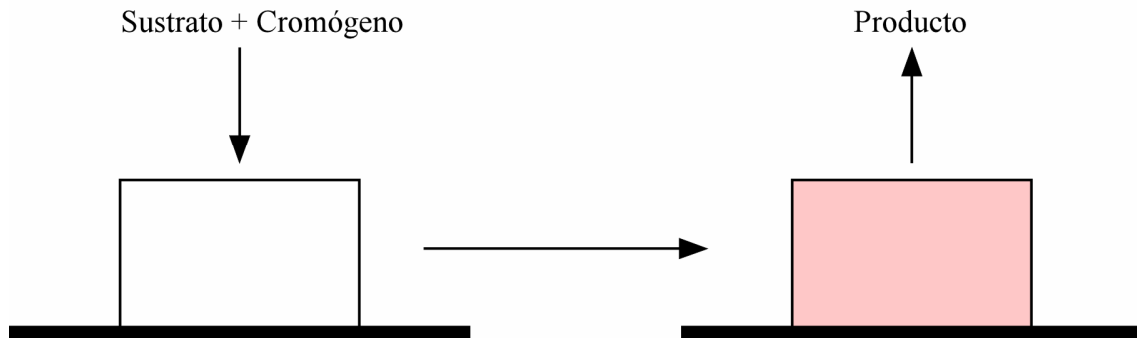




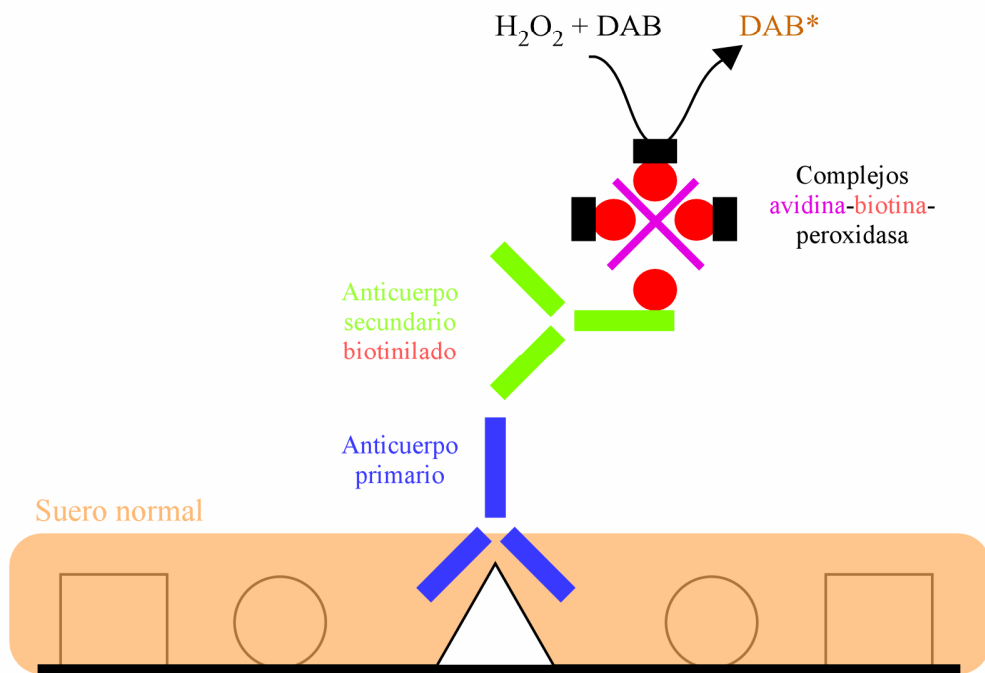
**FIGURA 2**

**Figura 2. Técnicas de marcaje empleadas.** Esquemas que muestran el fundamento de las técnicas histoquímicas (**A**) e inmunohistoquímicas (**B**). Las primeras se basan en la detección de la actividad de una enzima, que a partir de su sustrato y un cromógeno dan lugar al producto y a la precipitación del cromógeno, obteniéndose así la coloración de la enzima (**A**). Las segundas consisten en la detección de la presencia de una molécula por medio de anticuerpos. En **B**, se representa una técnica indirecta, que fue la empleada en este trabajo. El suero normal bloquea los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo primario, que se une a la molécula que se quiere detectar. A continuación, varios anticuerpos secundarios biotinilados se unen a la fracción constante del anticuerpo primario. Por último, los complejos avidina-biotina-peroxidasa se unen al anticuerpo secundario a través de su biotina. El  $H_2O_2$  es el sustrato de la enzima peroxidasa, y al producirse la reacción la DAB precipita. **Abreviaciones:** *DAB*, diaminobenzidina;  $H_2O_2$ , agua oxigenada.

## A. Técnica histoquímica



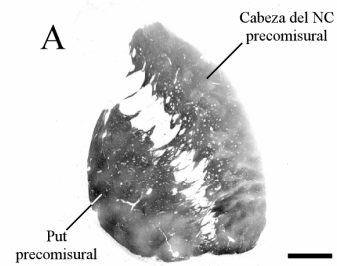
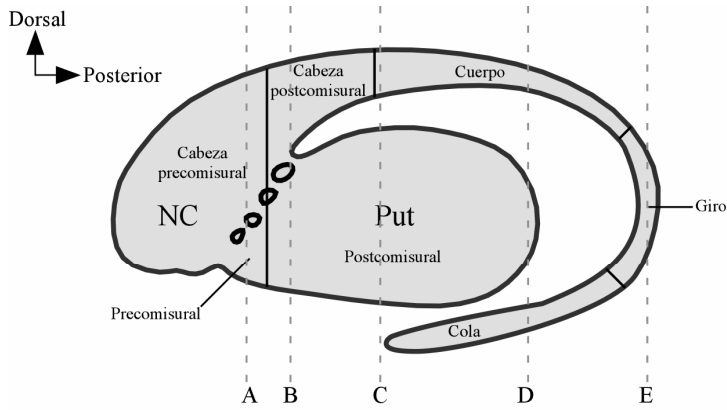
## B. Técnica inmunohistoquímica



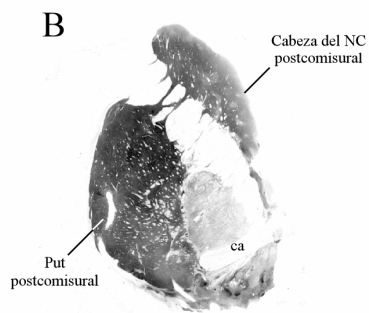


**FIGURA 3**

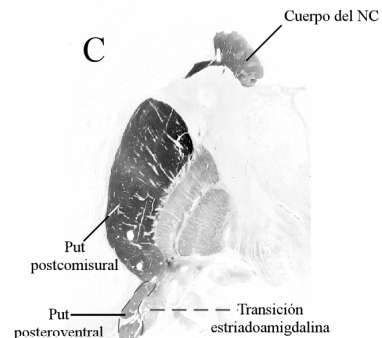
**Figura 3. División del estriado humano en el eje anteroposterior.** En primer lugar se muestra un esquema sagital del NC y del Put que ilustra las diferentes regiones en las que estos núcleos fueron divididos. Las líneas continuas indican los límites entre las diferentes regiones, mientras que las discontinuas representan los niveles de los cortes mostrados en **A-E**. Éstos son secciones coronales en las que se indican las diferentes regiones estriatales contenidas en cada nivel. Además, debajo de cada corte se señala el nivel correspondiente de los atlas empleados en este estudio. **Abreviaciones:** *ca*, comisura anterior; *NC*, núcleo caudado; *Put*, putamen. **Barra de calibración:** 5 mm.



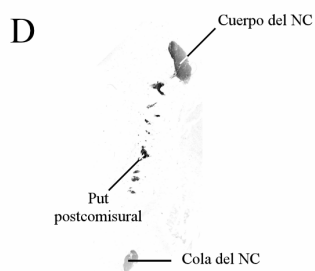
**Mai et al. 15**



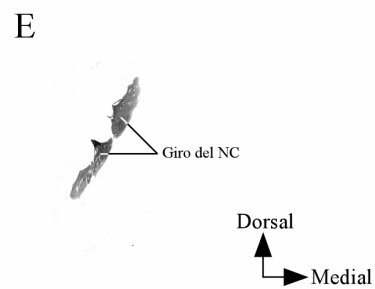
**Mai et al. 22**  
**Nowinski et al. SWc/Fa 13.5 #02**  
**Schaltenbrand&Wahren LXVIII Fa 13,5**



**Mai et al. 32**  
**Nowinski et al. SWc/Fa 2.0 #09**  
**Schaltenbrand&Wahren LXVIII Fa 2,0**



**Mai et al. 41**  
**Nowinski et al. SWc/Fp 13.0 #17**  
**Schaltenbrand&Wahren LXVIII Fp 13,0**



**Mai et al. 48**

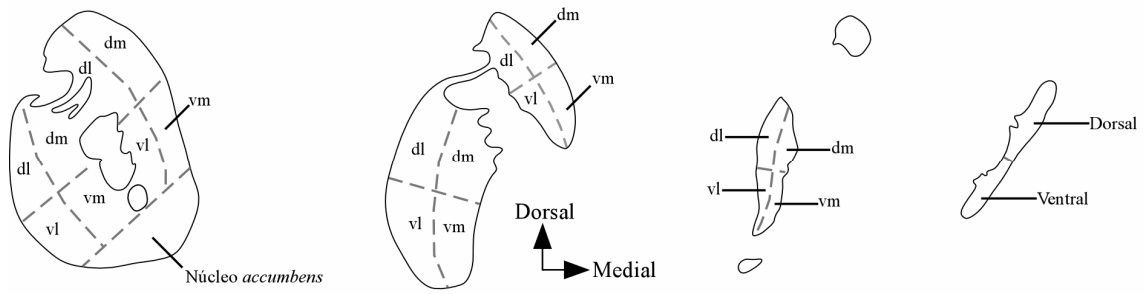




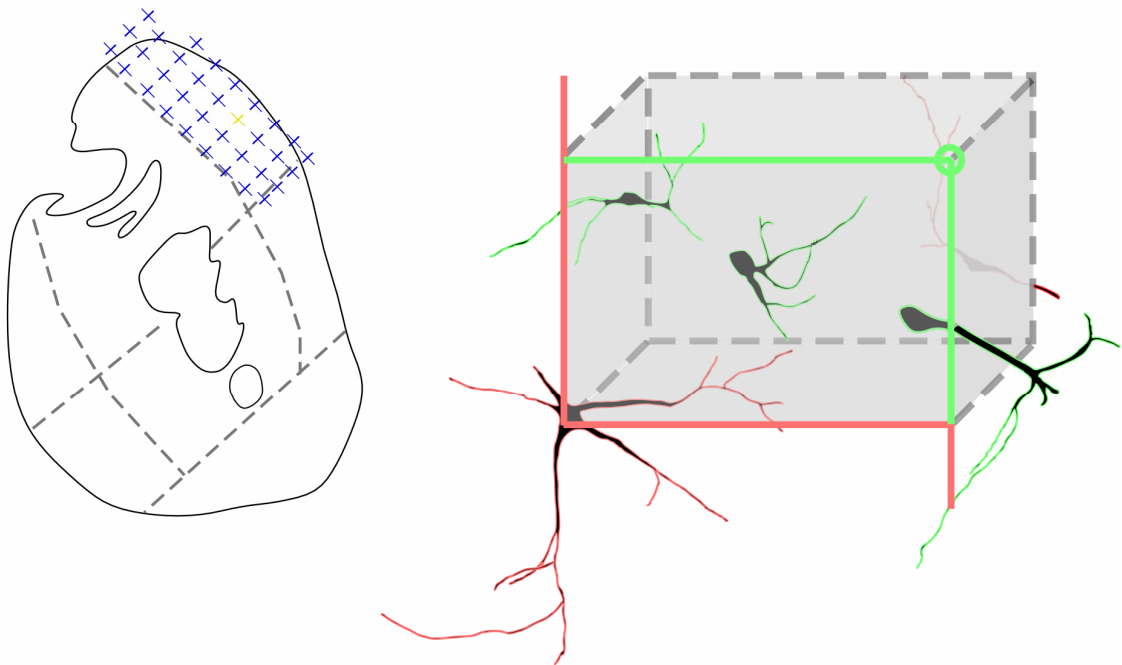
**FIGURA 4**

**Figura 4. División del estriado humano en los ejes dorsoventral y mediolateral para la aplicación del disector óptico.** En **A**, aparecen cuatro dibujos esquemáticos en los que se muestra la división de la cabeza del núcleo caudado y el putamen en cuatro sectores, y la del giro del núcleo caudado en dos mitades. En **B**, se detalla la división en disectores de uno de los cuadrantes de la cabeza precomisural del núcleo caudado, y se ilustra el criterio de selección de las neuronas en cada uno de los disectores. Aquellas neuronas cuyo cuerpo celular está completamente incluido en el disector son seleccionadas (contorno verde), mientras que los cuerpos neuronales que están parcial o totalmente fuera del disector son descartados (contorno rojo). **Abreviaciones:** *dl*, dorsolateral; *dm*, dorsomedial; *vl*, ventrolateral; *vm*, ventromedial.

### A. División del estriado en los ejes dorsoventral y mediolateral



### B. Empleo del disector óptico para el cálculo de la densidad neuronal





## ***4. RESULTADOS***



#### ***4.1. Descripción general de la anatomía química del estriado en toda su extensión anteroposterior***

Antes de proceder con el análisis de las interneuronas estriatales, este estudio se centró en la obtención de una visión global de la anatomía química del estriado, especialmente en sus regiones más posteriores. Aunque existen trabajos muy completos sobre la distribución de distintos marcadores celulares y de neuropilo en el estriado humano (Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1999), hemos considerado importante revisar con detalle el modo en que algunos de ellos ponían de manifiesto el compartimento estriosomal, para así determinar cuál sería el idóneo a la hora de analizar la organización compartimental de las distintas poblaciones de interneuronas. Una vez seleccionado el marcador ideal, se trataron con él series de seis cortes adyacentes para observar la variación de los estriosomas en ellos.

##### ***4.1.1. Anatomía química del estriado anterior***

Para la realización de este estudio, algunos cortes de los cerebros empleados en este análisis fueron procesados histoquímicamente con la técnica de la AChE, e inmunohistoquímicamente para la detección de ENK, LAMP, PV, CB y TH. Los resultados obtenidos fueron muy similares a las observaciones de Prensa y colaboradores (Prensa y cols., 1998; 1999). En resumen, las técnicas inmunohistoquímicas para la localización de ENK y LAMP revelaron con mayor precisión el complejo mosaico químico del estriado anterior, ya que pusieron de manifiesto con claridad el centro y la periferia del compartimento estriosomal. Sin embargo, siendo ambas técnicas apropiadas para visualizar la heterogeneidad estriosomal, la ENK permitía hacerlo con mayor nitidez en el microscopio convencional (Figura 5), mientras que con el revelado de LAMP los mejores resultados se obtenían en impresiones directas (véase un ejemplo de esta técnica de visualización en la Figura 5C-H, aunque el marcaje en este caso corresponde a la ENK; otros ejemplos de esta técnica con la detección de LAMP se muestran en Prensa, 1998 y Prensa et al., 1999).

Como el estudio de la distribución compartimental de las interneuronas se iba a llevar a cabo en el microscopio, y no a partir de impresiones directas, se tomó como marcador de referencia de la heterogeneidad estriatal a la ENK. En este caso, como en el de LAMP, el neuropilo de la periferia estriosomal quedaba claramente teñido, y

rodeaba a una zona con una intensidad igual o inferior al de la matriz estriatal (Figura 5). Algunos de los estriosomas aparecían homogéneos, fuertemente teñidos con ambas técnicas (Figura 5).

Tanto la técnica histoquímica para la visualización de la AChE, como el revelado inmunohistoquímico de la PV, CB y TH, ponían de manifiesto el compartimento estriosomal por tinción negativa. Es decir, los estriosomas carecían de estas proteínas, y la presencia del centro y de la periferia no era tan clara como en las técnicas anteriores. Por ello, aunque las correspondencias entre los distintos marcadores se tuvieron en cuenta a la hora de analizar el estriado posterior, estas técnicas fueron descartadas para el estudio de la organización compartimental de las interneuronas estriatales.

Por último, una vez seleccionada la ENK como el marcador idóneo de la heterogeneidad estriatal, se procedió al procesamiento de series de seis cortes adyacentes con esta técnica. El resultado, mostrado en la Figura 5C-H, pone de manifiesto la escasa variación que sufren los estriosomas en distancias pequeñas. Cada uno de estos cortes estaba separado por 50  $\mu\text{m}$ , y, como se observa en la figura mencionada, no se apreciaron grandes cambios en la anatomía de los estriosomas, ya fueran homogéneos o tuvieran una clara distinción entre el centro y la periferia, en estas distancias. Este hecho permitía el estudio de la organización compartimental de las interneuronas con cortes adyacentes teñidos con ENK, como se hizo en el caso de las interneuronas calbindina positivas.

Así pues, debido a la precisión de los trabajos previos acerca de la anatomía química del estriado en sus regiones anteriores y medias, este estudio se limitó a comprobar y corroborar esos resultados, y a seleccionar el mejor marcador para el estudio de la heterogeneidad estriatal.

#### *4.1.2. Anatomía química del estriado posterior*

Este estudio se llevó a cabo para confirmar la presencia del compartimento estriosomal en las porciones posteriores del estriado, y a continuación aplicar los datos obtenidos al análisis de la organización compartimental de las interneuronas. Como estriado posterior entendemos aquél que se extiende desde el comienzo del cuerpo del núcleo caudado hasta la finalización del giro del mismo. Así, este apartado comprende



el estudio de la anatomía química del cuerpo, giro y cola del núcleo caudado, y de la parte posterior del putamen postcomisural. Como marcadores se emplearon los citados en el apartado anterior: AChE, ENK, LAMP, PV, CB y TH. Algunos trabajos previos habían descrito la distribución de estos marcadores en el cuerpo del núcleo caudado y en el putamen posterior (Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1999), pero hasta el momento no se ha llegado a demostrar la presencia de la heterogeneidad estriosomal en el giro o en la cola del núcleo caudado, así como en la porción posterior del putamen.

Varias series de cortes adyacentes procedentes de distintos cerebros se trataron con las seis técnicas citadas anteriormente. En el cuerpo del núcleo caudado, se observaron numerosos estriosomas de forma redondeada con un fuerte marcaje de ENK y LAMP, pero un neuropilo pobre en AChE, PV y CB (Figura 6). En algunos de estos estriosomas se pudo observar la presencia del centro y de la periferia en la detección de ENK y LAMP. Cuando se llevó a cabo la técnica de la TH, los estriosomas aparecían rodeados de un fino anillo de neuropilo escasamente reactivo frente a esta enzima, y que no se había observado en niveles anteriores. Sin embargo, el estriosoma en sí mostraba un marcaje similar al de la matriz (Figura 8). Aunque no era la norma general, algunos estriosomas presentaban también este anillo alrededor con la técnica de la CB.

En el putamen apareció un patrón similar, aunque los estriosomas en general no tenían una forma redondeada, sino alargada. Los estriosomas también eran claramente inmunorreactivos frente a ENK y LAMP, algunos de ellos demostrando una organización en centro y periferia, pero carecían de PV (Figura 6). La AChE, como se ha visto en otros estudios, no delimita con claridad el borde estriosomal en el putamen. En el caso de la técnica de TH, el anillo inmunorreactivo encontrado en el cuerpo del núcleo caudado también estaba presente en algunos estriosomas del putamen, y parecía corresponder con los *clear septa* descritos por Graybiel y Chesselet (1984).

Este patrón anatómico seguía presente en zonas más posteriores del cuerpo del núcleo caudado, aunque los estriosomas se fueron haciendo más pequeños, y su organización en centro y periferia desapareció completamente. En el giro del núcleo caudado siguieron apareciendo algunos estriosomas a modo de pequeños parches redondeados y marcados homogéneamente con ENK y LAMP (Figura 7). Sin embargo, no se encontró ningún estriosoma en la cola del núcleo caudado. Los estriosomas también desaparecieron en el putamen a partir del nivel en el que éste empieza a fragmentarse en su zona más posterior.

Aunque los estriosomas desaparezcan en algunas zonas del estriado posterior, su complejidad química aumenta por la presencia de otros tipos de marcaje. Así, tanto en la porción más dorsolateral del núcleo caudado como en el borde lateral del putamen, se observó una fina banda fuertemente teñida con ENK y LAMP, y pobre en AChE y PV, es decir, con las mismas características químicas que el compartimento estriosomal (Figuras 6 y 8). Este borde se vio con mayor claridad rodeando las porciones ventrales del polo posterior del putamen (Figura 8).

Además de este borde con características similares al compartimento estriosomal, se observaron también gradientes de intensidad en los distintos marcajes en algunas zonas del estriado posterior. En concreto, la parte más posterior del cuerpo y el giro del núcleo caudado presentaron un gradiente creciente de AChE y PV que se extendía desde la parte dorsomedial hasta la ventrolateral (Figura 7). En la cola del núcleo caudado, aunque no se encontraron estriosomas, sí que apareció un gradiente opuesto al descrito en el giro del núcleo caudado cuando se procedió al revelado de AChE y PV. Curiosamente, la detección de ENK y LAMP también presentó una heterogeneidad clara en esta estructura, ya que, si bien no se trataba de un gradiente claro, las regiones más mediales aparecían más teñidas.

En definitiva, el estriado posterior muestra características químicas similares a las halladas en regiones anteriores, como es la presencia de estriosomas en todas las zonas estudiadas salvo en la cola del núcleo caudado, pero también presenta otras adicionales como son la presencia de bandas con una fuerte tinción en los bordes de algunas zonas del núcleo caudado y del putamen, o los gradientes en el marcaje del neuropilo.

#### ***4.2. Análisis de las interneuronas nitrérgicas***

La presentación de los resultados obtenidos tras el estudio de cada grupo de interneuronas se realizará en tres apartados distintos. En primer lugar, se procederá a la descripción anatómica general de las neuronas, que presenta una clara diferencia de planteamiento entre los tres grupos analizados: mientras que en el caso de las interneuronas nitrérgicas se ofrece una clasificación anatómica en distintos grupos según su morfología somatodendrítica, en los otros dos grupos neuronales se hace un mayor hincapié en la cuantificación morfológica, midiendo y analizando el volumen del soma en las distintas regiones estudiadas. Este cambio en el planteamiento se debió a la

imposibilidad de agrupar a las interneuronas colinérgicas y CB positivas en función de su morfología. En segundo lugar, se presentará el estudio de la distribución de las interneuronas en toda la extensión del estriado, dividido en sus ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral. De esta forma se precisan las regiones más pobladas por los distintos tipos de interneuronas. En tercer lugar, se analizará la organización compartimental de los grupos neuronales, estudiando en profundidad su posición con respecto a los estriosomas en las distintas regiones en las que fue dividido el estriado.

En el último apartado de estos **Resultados** se muestra la comparación de la distribución y la organización compartimental de los tres tipos de interneuronas estriatales.

#### *4.2.1. Características morfológicas*

La técnica histoquímica de la NADPH-d dio como resultado un marcaje violeta oscuro homogéneo que ponía de manifiesto una población de neuronas de tamaño variable, con dendritas bien definidas y sin espinas. La presencia del núcleo no era evidente en todas estas neuronas, aunque en ocasiones podía intuirse por la ausencia del precipitado violeta. Esta población neuronal parecía corresponder con aquéllas teñidas con las técnicas inmunohistoquímicas frente a NOS y SOM (Figura 12). De hecho, se encontraron morfologías neuronales idénticas con las distintas técnicas.

De acuerdo a su morfología somatodendrítica, se diferenciaron tres tipos de interneuronas nitrérgicas, presentes en todas las regiones del estriado.

a) Neuronas de soma triangular. Este tipo neuronal abarcaba el 13% del total de las interneuronas nitrérgicas. El cuerpo celular presentaba un aspecto triangular, por lo que se le podría atribuir un aspecto tridimensional cónico o piramidal (Figuras 9 y 10). Los valores medios de los ejes menor y mayor del soma eran 14 y 16  $\mu\text{m}$ , respectivamente, y su volumen promedió 2295  $\mu\text{m}^3$ . Estas neuronas presentaban normalmente 3 o 4 dendritas primarias gruesas, saliendo cada una de ellas de uno de los vértices del triángulo que formaba el soma. Estas dendritas se bifurcaban en las proximidades del cuerpo celular, dando lugar a dendritas secundarias de menor grosor, varicosas, y que se extendían sin ramificarse durante al menos 100  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, algunas de las dendritas primarias no llegaban a bifurcarse y se extendían hasta 50  $\mu\text{m}$  de distancia del soma celular. En ocasiones se observó una prolongación fina que

emergía de una de las dendritas primarias o del propio soma, y que fue identificada como el axón. Este tipo de neuronas fue también localizado en las preparaciones teñidas con la técnica histoquímica de NOS y SOM, aunque en estos casos las varicosidades dendríticas parecían tener un mayor volumen (Figura 12).

b) Neuronas de aspecto bipolar. Este grupo comprendía el 4% del total de las interneuronas nitrérgicas. Estaban caracterizadas por tener un soma ovoide o fusiforme desde el cual emergían en sentidos opuestos dos dendritas primarias gruesas, de igual diámetro, y escasamente ramificadas (Figuras 9 y 10). El valor de los ejes menor y mayor del soma de esta población fue 12 y 22  $\mu\text{m}$ , respectivamente, y su volumen medio 2375  $\mu\text{m}^3$ . Para no dejar al criterio del investigador la inclusión de neuronas de distintas morfologías en este grupo se estableció que, para ser consideradas de aspecto bipolar, las neuronas tenían que cumplir dos condiciones: 1) sus dendritas primarias tenían que ser del mismo diámetro; y 2) la longitud de estas dendritas tenía que ser igual o mayor que la longitud del eje mayor del soma. Estos criterios fueron tomados en cuenta al encontrar otras interneuronas de soma ovoide y con dos dendritas primarias, pero que no podían ser consideradas como bipolares. Así, estas neuronas pasaron al grupo de neuronas ovoides con dos dendritas primarias (véase el siguiente grupo neuronal). Las dendritas primarias de las neuronas de aspecto bipolar se ramificaban escasamente, dando lugar a prolongaciones finas y con pocas varicosidades que fueron seguidas hasta 600  $\mu\text{m}$  lejos del soma. Como en el grupo anterior, en algunas de estas neuronas se encontró una prolongación fina y poco varicosa que emergía de una dendrita primaria, y que parecía ser el axón. La presencia de estas neuronas también se demostró con las técnicas inmunohistoquímicas de NOS y SOM.

c) Neuronas de forma ovoide. Este grupo fue sin duda el más numeroso en el presente estudio, constituyendo el 83% del total de las interneuronas nitrérgicas estriatales. Además, presentaba una gran heterogeneidad en cuanto al tamaño del soma y al número de dendritas primarias que emergían del mismo (Figuras 9 y 11). El valor medio de los ejes menor y mayor fue 10 y 17  $\mu\text{m}$  respectivamente, y su volumen medio 1625  $\mu\text{m}^3$ . Debido a la gran variedad de neuronas con soma ovoide, se clasificaron según el número de dendritas primarias. Sin duda, las más numerosas eran aquéllas que presentaban 3 o 4 prolongaciones primarias (Figuras 9, 11 y 12). Aunque mucho menos numerosas, también se encontraron algunas que parecían tener una, dos, o cinco o más dendritas primarias (Figuras 9 y 11). Las neuronas con dos ramificaciones eran aquellas

que no cumplían alguno de los dos criterios establecidos para considerar una interneurona como de aspecto bipolar. Todos estos tipos morfológicos fueron encontrados en los cortes que fueron teñidos con la técnica de visualización de NOS y SOM.

Además de los distintos tipos morfológicos de neuronas encontrados en las preparaciones teñidas con la técnica histoquímica de la NADPH-d, se encontraron unas estructuras pequeñas, de un tamaño próximo a 4  $\mu\text{m}$ , que al principio fueron tomadas por neuronas pequeñas (Figura 12). Al emplear las técnicas inmunohistoquímicas para la visualización de las neuronas nitrérgicas, se comprobó que la mayor parte de estas estructuras estaban unidas a neuronas de un tamaño habitual, por lo cual se trataban de grandes varicosidades. Para comprobar si realmente existían neuronas nitrérgicas de pequeño tamaño, se recurrió a la doble técnica inmunohistoquímica frente a NOS y NeuN. De esta manera, se observó que las pequeñas estructuras independientes de otras neuronas de tamaño normal carecían de núcleo, por lo que se trataban de grandes varicosidades que, debido al procesamiento histológico, parecían separadas de su dendrita y por lo tanto podían ser confundidas con neuronas independientes (Figura 12). Estas grandes varicosidades se veían con una mayor definición con las técnicas inmunohistoquímicas, probablemente debido a que la detección de la presencia de una proteína a estos niveles es más efectiva que la detección de su actividad.

#### *4.2.2. Distribución a lo largo de los ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral*

Las neuronas NADPH-d positivas, independientemente de su morfología, aparecían ampliamente distribuidas en todas las regiones del estriado analizadas (Figura 13). El estudio estereológico llevado a cabo demostró que la región con una mayor densidad neuronal fue el giro del núcleo caudado. Por el contrario, la región menos densamente poblada fue el putamen precomisural (Figura 14). Una vez aplicado el disector óptico en todos los cortes seleccionados, se calculó la densidad media en cada región, teniendo en cuenta los datos obtenidos de los seis cerebros seleccionados para este estudio (casos 1-6 de la Tabla 1). Estos resultados se muestran en la Tabla 4 de este apartado.

**Tabla 4. Valores medios de la densidad de las neuronas nitrérgicas (neuronas/mm<sup>3</sup>) en las distintas regiones y sectores en los que se dividió el estriado humano<sup>1</sup>**

	dm	dl	vm	vl	TOTAL
NC	527±46	419±37	620±97	497±44	494±24
	1. Cabeza	T = 91 (17%)	T = 89 (21%)	T = 87 (14%)	T = 84 (17%)
	precomisural	B = 9 (2%)	B = 20 (5%)	B = 24 (4%)	B = 20 (4%)
		O = 427 (81%)	O = 310 (74%)	O = 509 (82%)	O = 390 (79%)
	871±145	925±114	615±122	776±145	820±66
	2. Cabeza	T = 64 (7%)	T = 112 (12%)	T = 18 (3%)	T = 66 (8%)
	postcomisural	B = 15 (3%)	B = 30 (4%)	B = 26 (5%)	B = 25 (3%)
		O = 792 (90%)	O = 783 (84%)	O = 571 (92%)	O = 729 (89%)
	3. Cuerpo				962±149
					T = 39 (4%)
					B = 48 (5%)
					O = 875 (91%)
		Dorsal		Ventral	
		1153±174		653±107	1060±142
	4. Giro	T = 77 (6%)		T = 86 (12%)	T = 95 (9%)
Put		B = 40 (4%)		B = 14 (3%)	B = 32 (3%)
		O = 1036 (90%)		O = 553 (85%)	O = 933 (88%)
	5. Cola				845±319
					T = 110 (13%)
					B = 34 (4%)
					O = 701 (83%)
	dm	dl	vm	vl	
	421±45	628±71	350±46	434±48	490±38
	6. Precomisural	T = 79 (19%)	T = 100 (16%)	T = 66 (19%)	T = 93 (19%)
		B = 36 (8%)	B = 20 (3%)	B = 14 (3%)	B = 25 (5%)
		O = 306 (73%)	O = 508 (81%)	O = 317 (73%)	O = 372 (76%)
	492±48	626±62	538±61	678±74	638±127
	7. Postcomisural	T = 57 (12%)	T = 92 (15%)	T = 36 (7%)	T = 72 (11%)
		B = 5 (1%)	B = 14 (3%)	B = 32 (5%)	B = 26 (4%)
		O = 430 (87%)	O = 488 (90%)	O = 574 (84%)	O = 542 (85%)

<sup>1</sup>Para cada uno de estos sectores, se indica la media ± SEM de la densidad de cada grupo morfológico y su proporción relativa. Los porcentajes están indicados entre paréntesis. B, con aspecto bipolar; dl, dorsolateral; dm, dorsomedial; NC, núcleo caudado; O, con soma ovoide; Put, putamen; T, con aspecto triangular; vl, ventrolateral; vm, ventromedial.

Posteriormente, aunque ninguna de las regiones seguía una distribución normal (prueba estadística de *Shapiro-Wilks* con una probabilidad asociada inferior a 0,01), los datos fueron analizados estadísticamente por medio de la prueba *ANOVA*, debido a su robustez. La prueba estadística a posteriori empleada para observar el origen de la significación de *ANOVA* fue la de *Tamhane*, a causa de la heterogeneidad de las varianzas de las muestras. El resultado de la prueba *ANOVA* proporcionó diferencias muy significativas ( $P=0,005$ ).

## Test of Homogeneity of Variances

densidad

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
12,429	6	430	,000

## ANOVA

densidad

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18598502	6	3099750,416	3,164	,005
Within Groups	4,21E+08	430	979663,472		
Total	4,40E+08	436			

El resultado de la prueba a posteriori reveló que la significación de *ANOVA* aparecía al compararse el giro con la cabeza precomisural del núcleo caudado ( $P=0,006$ ) y con el putamen precomisural ( $P=0,006$ ). También aparecían diferencias cuando la cabeza postcomisural se comparaba con la cabeza precomisural del núcleo caudado ( $P<0,001$ ) y con el putamen precomisural ( $P=0,001$ ). El resumen de las diferencias entre las medias de la densidad neuronal de las distintas regiones y su significación estadística aparecen recogidas en la Tabla 5.

**Tabla 5. Diferencia de las medias de las densidades de las interneuronas nitrérgicas en las distintas regiones del estriado<sup>1</sup>**

		NC					Put	
		Cabeza precomisural	Cabeza Postcomisural	Cuerpo	Giro	Cola	Precomisural	Postcomisural
NC	Cabeza precom.		-326 **	-468	-566 **	-350	4	-144
	Cabeza postcom.	326 **		-142	-240	-25	330 **	182
	Cuerpo	468	142		-98	117	472	324
	Giro	566 **	240	98		215	570 **	422
	Cola	350	25	-117	-215		355	207
Put	Precomisural	-4	-330 **	-472	-570 **	-355		-148
	Postcomisural	144	-182	-324	-422	-207	148	

<sup>1</sup> \*\* indica diferencias estadísticamente muy significativas ( $P<0,01$ ). NC, núcleo caudado; Put, putamen

La densidad de las interneuronas nitrérgicas en el núcleo caudado aumentó visiblemente entre el territorio precomisural y postcomisural (Figura 14, Tablas 4 y 5). Según se avanzaba en el eje anteroposterior, la densidad neuronal iba creciendo hasta alcanzar su máximo en el giro del núcleo caudado. De media, la densidad en el giro era aproximadamente dos veces la de la cabeza precomisural. Este aumento en el eje

anteroposterior apareció también en el putamen (Figura 14, Tablas 4 y 5), aunque el análisis posterior no reveló que esta diferencia tuviera significación estadística ( $P=0,999$ ). En este caso, el territorio postcomisural mostraba una densidad 1,3 veces superior a la del precomisural.

A la hora de comparar la densidad neuronal del núcleo caudado y del putamen, se aplicó una prueba *U* de *Mann-Whitney*, y no se observaron diferencias significativas ( $P=0,127$ ). El núcleo caudado resultó tener una densidad neuronal aproximadamente 1,4 veces mayor que la del putamen.

Si bien el número de cerebros y su heterogeneidad en algunos parámetros no eran demasiado altos, se trató de comprobar si la densidad de las interneuronas nitrérgicas del estriado variaba con la edad o el sexo del individuo del cual se obtuvo el cerebro. Así, se comparó la densidad celular del individuo 1 de la Tabla 1 (35 años) con la de los individuos 4 (67 años) y 5 (74 años). Las comparaciones de la densidad media no aportaron diferencias estadísticas aunque, al compararlo por regiones, el individuo más joven demostró tener una mayor densidad en el putamen precomisural que el individuo más anciano (*U* de *Mann-Whitney*,  $P=0,004$ ). Sin embargo, al no disponer de una población lo suficientemente grande y heterogénea como para realizar un análisis más profundo, esta diferencia no se consideró relevante. Además, no se encontraron diferencias significativas entre la densidad neuronal del estriado procedente de la única mujer (caso 2 de la Tabla 1), y la del varón de edad más aproximada (caso 6).

Una vez realizado el análisis estadístico de las diferencias en la densidad neuronal a lo largo del eje anteroposterior, se procedió a estudiar las diferencias en los ejes dorsoventral y mediolateral en cada una de las regiones que fueron divididas en sectores (es decir, la cabeza precomisural y postcomisural y el giro del núcleo caudado, el putamen precomisural y el postcomisural). En todas estas regiones se comparó por medio de *ANOVA* y *Tamhane* la densidad neuronal en los cuatro sectores en los que fue dividido el estriado (dorsomedial, ventromedial, dorsolateral y ventrolateral) con la excepción del giro del núcleo caudado que fue dividido en dos mitades (dorsal y ventral). Posteriormente, se calculó la densidad en las mitades dorsal y ventral, medial y lateral, y se compararon dos a dos por medio de las pruebas *t* de *Student* o *U* de *Mann-Whitney*, dependiendo de la homogeneidad de las muestras.



En la cabeza del núcleo caudado no se observaron diferencias estadísticas al comparar los cuatro sectores, ni en su región precomisural ni en la postcomisural. Sin embargo, analizando los valores medios de la densidad neuronal (Tabla 4), se puede observar un gradiente decreciente dorsoventral (Figura 15). En el caso del giro del núcleo caudado, este gradiente era más evidente, y presentó leves diferencias significativas (*U* de *Mann-Whitney*,  $P=0,046$ ) (Figura 15). En el análisis del putamen, la distribución de las interneuronas nitrérgicas resultó ser más heterogénea. En la región precomisural, las pruebas *ANOVA* y *Tamhane* revelaron diferencias estadísticamente significativas entre el sector dorsolateral y el ventromedial ( $P=0,013$ ) (Figura 15). Además, se observó que la densidad neuronal en esta región sufría un incremento ventrodorsal y mediolateral, ya que la comparación estadística entre la mitad dorsal y ventral, así como entre la mitad lateral y medial, ofrecieron diferencias significativas a favor de las citadas en primer lugar (*U* de *Mann-Whitney*,  $P=0,024$  y  $P=0,021$ , respectivamente) (Figura 15). En el putamen postcomisural no se encontraron diferencias estadísticas al comparar los cuatro sectores, ni al analizar las mitades dorsal y ventral. Sin embargo, se encontró que la mitad lateral tenía una densidad neuronal significativamente mayor que la mitad medial (*U* de *Mann-Whitney*,  $P=0,013$ ) (Figura 15). Curiosamente, aunque no aparecieron diferencias estadísticas, el putamen posteroventral resultó tener una mayor densidad neuronal que los sectores más dorsales (véase su localización en la Figura 3).

Con respecto a la distribución de los tres grupos morfológicos diferenciados de interneuronas nitrérgicas, este estudio demuestra que las neuronas de aspecto bipolar tuvieron una presencia constante a lo largo de las distintas regiones del estriado, mientras que las neuronas ovoides y triangulares presentaban ligeras variaciones (Figura 14). Las neuronas de soma ovoide fueron claramente las más abundantes en todas las regiones estriatales. Las neuronas triangulares ocuparon la segunda posición en cuanto a abundancia a lo largo de toda la extensión anteroposterior del estriado, salvo en el cuerpo del núcleo caudado. En esta región, las neuronas de aspecto bipolar tenían una presencia ligeramente superior (Figura 14). Además, en el sector ventromedial de la cabeza postcomisural del núcleo caudado, las interneuronas nitrérgicas de aspecto bipolar sobrepasaron también a las triangulares (Tabla 4).

En resumen, las interneuronas nitrérgicas son más abundantes en el núcleo caudado que en el putamen y, dentro de ellos, tienden a ocupar preferentemente las

zonas posteriores. Además, su densidad celular es mayor en la zona dorsal del núcleo caudado y en la mitad lateral del putamen. En la Figura 16 se muestra un esquema tridimensional resaltando las regiones con una mayor densidad de interneuronas nitrérgicas.

#### *4.2.3. Organización con respecto al compartimento estriosomal*

La distribución de las interneuronas NADPH-d positivas con respecto al compartimento estriosomal fue estudiada en las distintas regiones del estriado. En total, se dibujaron y analizaron 60 estriosomas, de los cuales 12 se encontraban en la cabeza precomisural del núcleo caudado, 11 en la cabeza postcomisural, 10 en el cuerpo, 7 en el giro, 10 en el putamen precomisural, y 10 en el postcomisural. Las observaciones realizadas fueron cuantificadas en diversos aspectos (véase la Tabla 6 al final de este apartado y la Figura 19), aunque estos datos han de ser complementados con las descripciones cualitativas que se explican a continuación. La distribución de los grupos morfológicos encontrados con respecto a la matriz, la periferia, y el centro estriosomal, no pareció seguir ningún patrón determinado. De hecho, los tres tipos neuronales aparecieron distribuidos aleatoriamente con respecto al compartimento estriosomal en todas las regiones analizadas. Por lo tanto, el estudio de la distribución compartimental de estas interneuronas se basó en el estudio de su localización independientemente de su morfología.

En la cabeza precomisural del núcleo caudado, las neuronas nitrérgicas eran abundantes tanto en la matriz como en los estriosomas. Se encontraron una gran cantidad de somas en las zonas intensamente marcadas con ENK, y también en los límites entre los estriosomas y la matriz (Figura 17). En este territorio, muchos de los estriosomas contaban con una zona central pobre en el neuropéptido ENK, tal y como había sido descrito con anterioridad (Prensa y cols., 1999). Las neuronas nitrérgicas intraestriosomales se encontraban tanto en el centro como en la periferia del compartimento químico, y algunas de ellas aparecían en el borde entre las dos subdivisiones estriosomales (Figura 17). También se encontraron estriosomas homogéneamente teñidos, más pequeños, en algunos de los cuales aparecieron interneuronas nitrérgicas. En este caso, como en el de los estriosomas heterogéneos, este tipo de neuronas se encontraban también en el límite entre la matriz y el estriosoma.

Es interesante señalar que el número de interneuronas nitrérgicas situadas en relación con los estriosomas de la cabeza postcomisural del núcleo caudado fue menor que en la región precomisural. En este caso, los estriosomas homogéneos eran más abundantes que los que presentaban un centro escasamente inmunorreactivo frente a ENK. En el interior de los estriosomas de ambos tipos, se encontraron neuronas nitrérgicas, que tendían a abandonar el centro topográfico del estriosoma y ocupar la zona periférica, aunque sin situarse en el borde. El hecho más llamativo encontrado en esta región fue el bajo número de interneuronas nitrérgicas en la matriz circundante a los estriosomas (Figura 17).

Todos los estriosomas encontrados en el cuerpo del núcleo caudado presentaban un aspecto homogéneo tras la técnica inmunohistoquímica de la ENK. En la parte anterior de esta región, la distribución de las interneuronas nitrérgicas con respecto a los estriosomas era muy similar a la descrita para la cabeza postcomisural del núcleo caudado. Se encontraron algunos somas dentro de los estriosomas, situados principalmente cerca de los bordes de los mismos, pero apenas aparecían interneuronas en la matriz circundante al compartimento estriosomal y en el límite entre los estriosomas y la matriz. Sin embargo, en la parte posterior del cuerpo del núcleo caudado no se encontraron apenas interneuronas en el interior de los estriosomas, y apareció un número considerable de somas entre la matriz y el compartimento estriosomal (Figura 17).

Este patrón fue encontrado también en los pocos estriosomas hallados en el giro del núcleo caudado. En este caso se trataba de pequeños parches teñidos homogéneamente, y que se encontraban principalmente en la mitad dorsal de esta región estriatal. El número de estriosomas con interneuronas en su interior resultó ser bajo aunque, sin embargo, sí que era frecuente encontrar neuronas en el límite entre la matriz y los estriosomas (Figura 18). Como se ha mencionado en el apartado anterior, en la cola del núcleo caudado no se observó ningún estriosoma.

La mayoría de los estriosomas encontrados en toda la extensión anteroposterior del putamen presentaban una clara distinción entre el centro y la periferia. Algunos de estos estriosomas estaban rodeados por un fino haz de fibras, que probablemente correspondía con los *clear septa* descrito por Graybiel y Chesselet (1984) (Figura 18). Sin embargo, la distribución compartimental de las interneuronas nitrérgicas variaba entre las regiones precomisural y postcomisural del putamen. En la región más anterior,

el número de interneuronas en el interior de los estriosomas era menor. Además, se encontraron menos interneuronas en los bordes entre los distintos compartimentos, y en la matriz que circundaba a los estriosomas. La cantidad de somas en el centro estriosomal era mayor en el putamen postcomisural que en el precomisural (Figura 18). En términos generales, se podría decir que la organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas en el putamen precomisural era similar a la de la cabeza postcomisural del núcleo caudado, mientras que la del putamen postcomisural se asemejaba a la del núcleo caudado precomisural.

A continuación se presenta el análisis cuantitativo de la distribución compartimental de las interneuronas nitrérgicas con respecto a los estriosomas. En la Tabla 6, las cifras indicadas corresponden al número de estriosomas que mostraban las características indicadas, y no al número de interneuronas encontradas. Para una mayor comprensión de estos datos, en la Figura 19 se presenta un gráfico que recoge el análisis cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas. Además, en la Figura 20 se ofrece una visión tridimensional esquemática de un estriosoma que representa la relación entre las interneuronas y el compartimento estriosomal en todas las regiones del estriado.

**Tabla 6. Estudio cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas**

<i>Estriosomas</i>		<i>Con neuronas en el interior</i>		<i>Con neuronas en el borde</i>		<i>Sin relación con neuronas</i>	
		ENK +	ENK -	Matriz/estr.	Centro/perif.	Homogéneo	Heterogéneo
Cabeza precom.	n = 12 (5/7) <sup>1</sup>	9/12 (75%)	5/7 (71%)	9/12 (75%)	7/7 (100%)	2/5 (40%)	0/7 (0%)
Cabeza postcom.	n = 11 (6/5)	8/11 (73%)	3/5 (60%)	5/11 (45%)	1/5 (20%)	0/6 (0%)	2/5 (40%)
Cuerpo	n = 10 (10/0)	4/10 (40%)	-	10/10 (100%)	-	0/10 (0%)	-
Giro	n = 7 (7/0)	2/7 (29%)	-	5/7 (71%)	-	1/7 (14%)	-
Putamen precom.	n = 10 (4/6)	7/10 (70%)	1/6 (17%)	8/10 (80%)	1/6 (17%)	1/4 (25%)	0/6 (0%)
Putamen postcom.	n = 10 (6/4)	8/10 (80%)	1/4 (25%)	10/10 (100%)	4/4 (100%)	0/6 (0%)	0/4 (0%)

<sup>1</sup>n representa el número de estriosomas analizados en cada región (homogéneos/con centro y periferia).

Cada dato de la tabla representa el número de estriosomas que cumplieron las características mencionadas, indicándose el porcentaje respecto a los estriosomas (homogéneos, heterogéneos, o todos)

estudiados en esa región. ENK, encefalina; estr., estrioso; perif., periferia; postcom., postcomisural; precom., precomisural.

### 4.3. Análisis de las interneuronas colinérgicas

La técnica inmunohistoquímica de la ChAT reveló un conjunto de neuronas de gran tamaño e intensamente teñidas, sin espinas, incluidas en un neuropilo débilmente teñido (Figura 21). Según se ha visto en otros trabajos, el marcaje del neuropilo con esta técnica puede permitir la visualización de los dos compartimentos estriales, pero no lo hace con la misma definición que la ENK (Mesulam y cols., 1984; Selden y cols., 1994b; Holt y cols., 1997). Además, en este estudio se trató de obtener una tinción suficiente de las neuronas sin obtener apenas marcaje de fondo inespecífico, por lo que el neuropilo no quedó bien definido.

#### 4.3.1. Características morfológicas

Las neuronas colinérgicas reveladas con esta técnica tenían un diámetro que oscilaba entre las 20 y las 60  $\mu\text{m}$ , lo cual las convierte en las neuronas más grandes de todas las que pueblan el estriado. Su morfología somatodendrítica era muy variable, tanto que no fue posible elaborar una clasificación en grupos independientes. Se encontraron neuronas con soma ovoide, triangular, poligonal o fusiforme, que estaban presentes a lo largo de todo el estriado sin una especial prevalencia (Figuras 21 y 22). El número de dendritas primarias que presentaban este tipo de neuronas variaba entre 2 y 6, y también se encontraron neuronas colinérgicas de aspecto bipolar. Las dendritas primarias eran gruesas, en ocasiones varicosas, y con un grado de arborización variable. En cualquier caso, se ramificaban en las proximidades del cuerpo celular. Las dendritas secundarias, mucho más finas que las primarias, no se apreciaban con claridad (Figuras 21 y 22).

Debido a las dificultades para elaborar una clasificación totalmente objetiva de la morfología de estas neuronas, se optó por cuantificar su morfología por medio del volumen del soma. De esta manera, se aplicó la técnica del *nucleator* a un total de 1255 neuronas seleccionadas al azar por medio del disector óptico. El volumen medio total de

estas interneuronas en todo el estriado fue  $8333 \pm 163 \mu\text{m}^3$ . Los resultados de estas mediciones se muestran en la Tabla 7, así como en la Figura 24.

**Tabla 7. Valor medio del volumen del soma de las interneuronas colinérgicas en las distintas regiones del estriado humano**

	<i>Cabeza precom.</i>	<i>Cabeza postcom.</i>	<i>Cuerpo</i>	<i>Giro</i>	<i>Cola</i>	<i>Putamen precom.</i>	<i>Putamen postcom.</i>
<b>Volumen<sup>1</sup></b>	8271 $\pm$ 247	6950 $\pm$ 310	7149 $\pm$ 502	10828 $\pm$ 2394	7203 $\pm$ 989	9671 $\pm$ 312	7825 $\pm$ 266
<b>n</b>	392	162	76	48	8	280	280

<sup>1</sup>El volumen se expresa en  $\mu\text{m}^3$ , y se indica el valor de la media  $\pm$  SEM. n indica el número de neuronas medidas en cada región. postcom., postcomisural; precom., precomisural.

Estos valores fueron comparados por medio de la prueba *ANOVA*, que resultó ser muy significativo ( $P < 0,001$ ).

#### Test of Homogeneity of Variances

Volumen del soma

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,124	6	1248	,000

#### ANOVA

Volumen del soma

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,30E+09	6	217213061,7	6,816	,000
Within Groups	3,98E+10	1248	31868609,48		
Total	4,11E+10	1254			

Debido a la heterogeneidad de varianzas de las muestras, se empleó *Tamhane* como prueba a posteriori, y se observó que aparecían diferencias significativas entre la cabeza precomisural y postcomisural del núcleo caudado ( $P = 0,02$ ), y muy significativas entre el putamen precomisural y el postcomisural ( $P = 0,001$ ) (Figura 24). Sin embargo, no se puede concluir que el soma neuronal sea mayor en los territorios precomisurales que en los postcomisurales, ya que la región que contiene las neuronas con somas de mayor tamaño es el giro del núcleo caudado (Tabla 7, Figura 24). La prueba estadística de *Tamhane* también reveló diferencias muy significativas entre el putamen

precomisural y la cabeza precomisural ( $P<0,001$ ), postcomisural ( $P<0,001$ ), y el cuerpo ( $P=0,001$ ) del núcleo caudado (Figura 24). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el volumen del soma de las neuronas colinérgicas en las distintas regiones estriatales entre el cerebro de los individuos más jóvenes (casos 1 y 7 de la Tabla 1), y el de los más ancianos (casos 5 y 8).

#### 4.3.2. Distribución a lo largo de los ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral

Las interneuronas colinérgicas aparecieron aleatoriamente distribuidas a lo largo de todo el eje anteroposterior del estriado (Figura 23). Los casos escogidos para el estudio estereológico fueron el 1, 2, 3, 7, 8 y 9 de la Tabla 1. Los casos 4, 5 y 6 no presentaron un marcaje inmunohistoquímico adecuado para el recuento neuronal, por lo que fueron descartados para este estudio. Estas interneuronas ocuparon preferentemente el núcleo caudado, siendo su densidad 1,8 veces mayor que la del putamen (Figuras 23 y 24). La prueba estadística *U* de *Mann-Whitney* reveló que esta diferencia entre el núcleo caudado y el putamen era muy significativa ( $P<0,001$ ). La región estriatal más densamente poblada por estas interneuronas resultó ser el cuerpo del núcleo caudado, seguido por la cola, la cabeza postcomisural, el giro, la cabeza precomisural, el putamen postcomisural y el precomisural (Figura 24). Un resumen de los resultados obtenidos tras la aplicación del disector óptico se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8. Valores medios de la densidad de las neuronas colinérgicas (neuronas/mm<sup>3</sup>) en las distintas regiones y sectores en los que se dividió el estriado humano<sup>1</sup>**

	<i>dm</i>	<i>dl</i>	<i>vm</i>	<i>vl</i>	<i>Total</i>
Cabeza precom.	489 ± 23	284 ± 22	370 ± 25	248 ± 21	349 ± 14
Cabeza postcom.	649 ± 68	433 ± 56	377 ± 48	402 ± 43	462 ± 32
Cuerpo					513 ± 63
Giro		<i>Dorsal</i> 351 ± 73		<i>Ventral</i> 459 ± 84	400 ± 61
Cola					481 ± 223
Putamen precom.	162 ± 22	277 ± 26	168 ± 27	224 ± 26	219 ± 19
Putamen postcom.	291 ± 27	325 ± 25	215 ± 21	275 ± 29	258 ± 17

<sup>1</sup>Para cada uno de estos sectores, se indica la media  $\pm$  SEM de la densidad. dl, dorsolateral; dm, dorsomedial; vl, ventrolateral; vm, ventromedial.

Los valores de la densidad neuronal en cada una de las regiones anteroposteriores del estriado se compararon por medio de las pruebas estadísticas *ANOVA* y *Tamhane*. La probabilidad asociada al primero de ellos fue 0,005, por lo que se concluyó que existían diferencias muy significativas entre las distintas regiones. La prueba a posteriori demostró que existían diferencias muy significativas cuando tanto el putamen precomisural como el postcomisural eran comparados con la cabeza precomisural ( $P < 0,001$  y  $P = 0,001$ , respectivamente), la cabeza postcomisural ( $P < 0,001$  en ambos casos) y el cuerpo ( $P < 0,001$  y  $P = 0,005$ , respectivamente) del núcleo caudado (Figura 24).

#### Test of Homogeneity of Variances

densidad			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
17,320	6	399	,000

#### ANOVA

densidad					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4507124	6	751187,316	3,132	,005
Within Groups	95698830	399	239846,693		
Total	1,00E+08	405			

El resumen de las diferencias entre las medias de la densidad neuronal de las distintas regiones y su significación estadística según la prueba estadística a posteriori (*Tamhane*) aparece recogido en la Tabla 9.

**Tabla 9. Diferencia de las medias de las densidades de las interneuronas colinérgicas en las distintas regiones del estriado<sup>1</sup>**



	NC					Put	
	Cabeza precomisural	Cabeza Postcomisural	Cuerpo	Giro	Cola	Precomisural	Postcomisural
NC	Cabeza precom.	-113 *	-164	-51	-132	130 **	91 **
	Cabeza postcom.	113 *	-51	62	-19	243 **	204 **
	Cuerpo	164	51	113	32	294 **	255 **
	Giro	51	-62	-113	-81	181	142
	Cola	132	19	-32	81	263	223
Put	Precomisural	-130 **	-243 **	-294 **	-181	-263	-39
	Postcomisural	-91 **	-204 **	-255 **	-142	-223	39

<sup>1</sup> \*indica diferencias estadísticamente significativas ( $0,05 > P > 0,01$ ) y \*\* muy significativas ( $P < 0,01$ ).

NC, núcleo caudado; Put, putamen

En el núcleo caudado, la densidad neuronal aumentó visiblemente al pasar de la cabeza precomisural a la postcomisural. Esta tendencia se mantuvo hasta alcanzar el máximo en el cuerpo. La cola del núcleo caudado, que aparece aproximadamente al mismo nivel anteroposterior que el cuerpo, también estaba poblada por una gran cantidad de neuronas colinérgicas. Sin embargo en el giro, que está situado entre el cuerpo y la cola, la densidad disminuyó notablemente (Tabla 8, Figura 24). A las diferencias encontradas al aplicar las pruebas anteriores, hay que añadir las diferencias significativas que se hallaron al comparar la cabeza precomisural con la postcomisural ( $P=0,034$ ). En el putamen, el número de neuronas colinérgicas también aumentó al sobrepasarse la comisura anterior. Este aumento fue menos pronunciado que el encontrado en el núcleo caudado y, de hecho, no hubo diferencias estadísticas en la prueba a posteriori citada anteriormente ( $P=0,942$ ). Con respecto a las diferencias entre el núcleo caudado y el putamen en la zona precomisural, la prueba *U* de *Mann-Whitney* mostró diferencias muy significativas ( $P<0,001$ ), siendo la densidad en el núcleo caudado 1,6 veces mayor que en el putamen. En la zona postcomisural, la diferencia estadística entre ambos no fue tan pronunciada ( $P=0,024$ ), aunque en este caso el núcleo caudado tenía una densidad neuronal 1,8 veces superior a la del putamen, y, por lo tanto, similar a la diferencia total entre el núcleo caudado y el putamen.

Para evaluar el posible efecto de la edad sobre la densidad de las interneuronas colinérgicas del estriado, se compararon los datos procedentes de los individuos más jóvenes (casos 1 y 7 de la Tabla 1), con aquéllos procedentes de los individuos más ancianos (casos 5 y 8). La comparación de la densidad neuronal total entre los individuos 1 y 5 aportó diferencias muy significativas, empleando la prueba estadística

*U de Mann-Whitney* ( $P=0,001$ ), siendo la media de la densidad del individuo más joven menor que la del más anciano. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas cuando esta comparación se llevó a cabo zona por zona. Cuando se compararon el individuo 1 y el 8, los resultados fueron muy similares. Sin embargo, la comparación entre el individuo de 20 años (caso 7) y los datos procedentes de los cerebros de los individuos más ancianos no aportó diferencias estadísticas en la densidad de las neuronas colinérgicas en todo el estriado, y sólo aparecieron ligeras diferencias en el cuerpo y la cola del núcleo caudado. Curiosamente, la comparación entre la densidad neuronal total entre los dos individuos jóvenes (casos 1 y 7) resultó en diferencias muy significativas (*U de Mann-Whitney*,  $P=0,004$ ), siendo mayor en el cerebro más joven. Cuando se comparó la densidad entre los cerebros procedentes de los individuos más ancianos, no se encontraron diferencias estadísticas (*U de Mann-Whitney*,  $P=0,917$ ). En definitiva, estos resultados demuestran que la densidad de las interneuronas colinérgicas en el estriado varía ligeramente entre distintos individuos, aunque la edad no parece ser una fuente clara de variación. La distribución de las interneuronas colinérgicas entre las distintas regiones del núcleo caudado y del putamen permanece prácticamente constante, y no está sujeta a grandes variaciones interindividuales.

En cuanto a la distribución de las interneuronas colinérgicas en el eje dorsoventral y mediolateral en las distintas regiones estriatales, se aplicó un *ANOVA* con *Tamhane* y *Tukey B* como pruebas a posteriori en la cabeza precomisural y postcomisural del núcleo caudado, así como en el putamen precomisural y postcomisural. De esta manera se comparó la densidad neuronal de los cuatro sectores en los que fueron divididas estas regiones. Por otra parte, las mitades dorsales y ventrales, mediales y laterales fueron comparadas con la prueba *U de Mann-Whitney*. En la cabeza precomisural del núcleo caudado, el sector dorsomedial fue el más densamente poblado, mostrando diferencias muy significativas en el *ANOVA* ( $P<0,001$ ). En este caso, estas diferencias se aclararon con la prueba estadística a posteriori de *Tukey B*, debido a la homogeneidad de las varianzas (prueba de *Levene*,  $P=0,325$ ). Esta prueba demostró diferencias estadísticas entre el sector dorsomedial y el resto de los sectores, y entre el ventromedial y los dos restantes (Figura 25).

## Test of Homogeneity of Variances

Cell density (cells/mm3)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,161	3	336	,325

## ANOVA

Cell density (cells/mm3)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2924913	3	974970,981	22,099	,000
Within Groups	14823456	336	44117,428		
Total	17748369	339			

## Cell density (cells/mm3)

Sector		N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Tukey B <sup>a</sup>	Ventrolateral	85	248,4921	370,1649	489,3568
	Dorsolateral	85	284,4708		
	Ventromedial	85			
	Dorsomedial	85			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 85,000.

Además, en esta región del núcleo caudado se vieron diferencias muy significativas entre la mitad dorsal y la ventral ( $P < 0,001$ ), y entre la medial y la lateral ( $P < 0,001$ ), a favor de la dorsal y la medial (Figura 25).

En la cabeza postcomisural del núcleo caudado, el sector dorsomedial fue de nuevo el más densamente poblado por las neuronas colinérgicas. De hecho, este sector contenía la mayor densidad de este tipo de interneuronas encontrada en todos los sectores y regiones del estriado. En este caso, el *ANOVA* volvió a ofrecer diferencias muy significativas ( $P = 0,002$ ), y se tuvo que recurrir a *Tamhane* como prueba a posteriori, hallando diferencias muy significativas al comparar el sector dorsomedial con el ventromedial ( $P = 0,009$ ), y significativas al hacerlo con el ventrolateral ( $P = 0,018$ ) (Figura 25). También se encontraron diferencias estadísticas al comparar la mitad dorsal con la ventral ( $P = 0,035$ ) a favor de la dorsal, pero no en la comparación entre la mitad medial y la lateral ( $P = 0,167$ ) (Figura 25). En el giro del núcleo caudado, la mitad ventral contuvo una mayor densidad que la dorsal, pero no se encontraron diferencias estadísticas ( $P = 0,327$ ).

El putamen precomisural mostró una mayor densidad neuronal en su sector dorsolateral. El *ANOVA* reveló diferencias muy significativas ( $P=0,007$ ), que se pusieron de manifiesto al emplear *Tukey B* como prueba a posteriori. En este caso, el sector dorsolateral presentaba una densidad similar a la del sector ventrolateral, pero estadísticamente superior a la de los sectores dorsomedial y ventromedial (Figura 25). Además, la mitad lateral resultó tener una densidad neuronal mayor que la medial ( $P<0,001$ ), y no se encontraron diferencias entre la mitad dorsal y ventral ( $P=0,214$ ). En el putamen postcomisural, el patrón fue similar, ya que el sector más densamente poblado fue el dorsolateral (*ANOVA*,  $P=0,035$ ). Estas diferencias se aclararon al comparar el sector dorsolateral con el ventromedial (*Tamhane*,  $P=0,011$ ) (Figura 25). Finalmente, el putamen posteroventral mostró una densidad particularmente baja ( $208\pm65$  neuronas/mm<sup>3</sup>). Los análisis estadísticos revelaron diferencias muy significativas entre las mitades dorsal y ventral del putamen postcomisural ( $P=0,002$ ), pero no entre la medial y la lateral ( $P=0,087$ ) (Figura 25).

En resumen, las interneuronas colinérgicas ocupan en mayor medida el núcleo caudado que el putamen. Además, tienden a poblar las regiones medias y posteriores en el eje anteroposterior de ambas estructuras estriatales. Dentro del núcleo caudado, ocupan preferentemente la zona dorsomedial. En el putamen, por el contrario, son más abundantes en la región dorsolateral. En la Figura 26 se muestra un esquema tridimensional en el que se detallan aquellas zonas estriatales donde las interneuronas colinérgicas son más abundantes.

#### 4.3.3. Organización con respecto al compartimento estriosomal

La distribución de las interneuronas colinérgicas con respecto al compartimento estriosomal fue analizada en un total de 61 estriosomas, localizados en las distintas regiones del estriado humano de la siguiente manera: 13 en la cabeza precomisural, 11 en la cabeza postcomisural, 7 en el cuerpo y 4 en el giro del núcleo caudado; 9 en el putamen precomisural, y 17 en el postcomisural. Estos estriosomas fueron dibujados y algunos de sus parámetros fueron cuantificados y quedan resumidos en la Tabla 10. Además, se detalla a continuación una descripción cualitativa de la organización de las interneuronas colinérgicas con respecto a los estriosomas en las distintas regiones estriatales.

En la cabeza precomisural del núcleo caudado, las interneuronas aparecieron distribuidas aleatoriamente en la matriz y en los estriosomas, aunque el número fue claramente mayor en la primera (Figura 27). Aun así, de los 13 estriosomas analizados, sólo un pequeño parche homogéneo en el extremo dorsal del núcleo caudado apareció totalmente despoblado de interneuronas. Éstas se localizaban principalmente en el neuropilo rico en ENK y en el borde entre los distintos compartimentos, mientras que apenas se encontraron en el centro de los estriosomas heterogéneos. El número de somas dentro de los estriosomas era variable, habiendo algunos en cuyo interior la presencia de neuronas era prácticamente igual a la de la matriz, y otros en los que se encontró una única neurona.

En la cabeza postcomisural del núcleo caudado, el patrón de distribución de las interneuronas colinérgicas fue similar al anterior, aunque su número en el interior de los estriosomas fue menor (Figura 27). El centro pobre en ENK de los estriosomas heterogéneos apenas fue poblado por estas neuronas, que aparecían principalmente en el borde entre el estriosoma y la matriz. Tanto en los estriosomas homogéneos como en aquéllos que presentaban centro y periferia, el número de interneuronas en las zonas ricas en ENK también fue bajo, siendo habitual encontrar 2 o 3 neuronas. La presencia de neuronas colinérgicas entre el centro y la periferia estriosomales también disminuyó considerablemente.

En el cuerpo del núcleo caudado continuó la tendencia de las interneuronas colinérgicas a separarse de los estriosomas. Aunque los datos de la Tabla 10 indiquen que un 86% de los estriosomas analizados tenían interneuronas en su interior, es necesario puntualizar que en cada uno de ellos se encontró un único soma, por lo que, a pesar de la cifra, se observó una clara disminución del número de interneuronas en el compartimento estriosomal de esta región estriatal (Figura 27). Además, la presencia de interneuronas en el límite entre ambos compartimentos y en la matriz circundante a los estriosomas también se vio reducida. En el giro del núcleo caudado, esta tendencia llegó al extremo (Figura 28). No se encontró ningún estriosoma que contuviera alguna interneurona colinérgica, que tampoco poblaron los límites entre ambos compartimentos.

En el putamen precomisural, todos los estriosomas analizados estaban relacionados con las interneuronas colinérgicas en algún aspecto. Su presencia en el centro de los estriosomas heterogéneos fue escasa, apareciendo una neurona en los tres

estriosomas de este tipo analizados (Figura 28). En las regiones ricas en ENK la presencia fue mayor, asemejándose a la descrita para la cabeza del núcleo caudado postcomisural. Sin embargo, se encontraron pocos somas en los límites entre los distintos compartimentos, tanto en el borde matriz/estriosoma como en el centro/periferia. Este aspecto representó una diferencia importante con respecto a la cabeza del núcleo caudado postcomisural.

Por último, en el putamen postcomisural se observó un patrón parecido al de la cabeza precomisural del núcleo caudado, como ya ocurriera con las interneuronas nitrérgicas. En este caso, el número de somas en el compartimento rico en ENK fue bastante elevado, en ocasiones similar al de la matriz (Figura 28). De los 17 estriosomas analizados, sólo uno homogéneo y otro heterogéneo aparecieron completamente despoblados de interneuronas colinérgicas. La presencia de neuronas en el centro estriosomal fue baja, aunque la proporción de estriosomas con interneuronas en la región estriosomal pobre en ENK fue la más elevada de todos los territorios del estriado. En la mayoría de los estriosomas analizados apareció al menos un soma en el límite entre el compartimento estriosomal y la matriz. Su presencia en el borde centro/periferia de los estriosomas fue más reducida.

Como en el caso de las interneuronas nitrérgicas, en la Tabla 10 se muestra el análisis cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas colinérgicas. Estos datos aparecen representados en el gráfico de la Figura 29. Además, en la Figura 30 se ofrece una visión tridimensional y esquemática de un estriosoma que ilustra la relación entre las interneuronas y el compartimento estriosomal en todas las regiones del estriado.

**Tabla 10. Estudio cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas colinérgicas**

<i>Estriosomas</i>		<i>Con neuronas en el interior</i>		<i>Con neuronas en el borde</i>		<i>Sin relación con neuronas</i>	
		ENK +	ENK -	Matriz/estr.	Centro/perif.	Homogéneo	Heterogéneo
Cabeza precom.	n = 13 (8/5) <sup>1</sup>	10/13 (77%)	1/5 (20%)	10/13 (77%)	4/5 (80%)	1/8 (12%)	0/5 (0%)
Cabeza postcom.	n = 11 (5/6)	8/11 (73%)	1/6 (17%)	9/11 (82%)	4/6 (67%)	0/5 (0%)	0/6 (0%)
Cuerpo	n = 7 (7/0)	6/7 (86%)	-	3/7 (43%)	-	1/7 (14%)	-

Giro	n = 4 (4/0)	0/4 (0%)	-	0/4 (0%)	-	4/4 (100%)	-
Putamen precom.	n = 9 (6/3)	9/9 (100%)	1/3 (33%)	5/9 (56%)	1/3 (33%)	0/6 (0%)	0/3 (0%)
Putamen postcom.	n = 17 (12/5)	12/17 (71%)	2/5 (40%)	13/17 (76%)	2/5 (40%)	1/12 (8%)	1/5 (20%)

<sup>1</sup>n representa el número de estriosomas analizados en cada región (homogéneos/con centro y periferia).

Cada dato de la tabla representa el número de estriosomas que cumplieron las características mencionadas, indicándose el porcentaje respecto a los estriosomas (homogéneos, heterogéneos, o todos) estudiados en esa región. ENK, encefalina; estr., estriosoma; perif., periferia; postcom., postcomisural; precom., precomisural.

#### 4.4. Análisis de las interneuronas calbindina positivas

La técnica inmunohistoquímica de la CB reveló dos tipos de neuronas bien diferenciados. El más numeroso fue a su vez el más pobremente teñido, ya que sólo alcanzaba a marcarse el soma con una tinción muy suave. Estos cuerpos neuronales tenían forma redondeada, y parecían estar presentes a lo largo de todas las regiones topográficas del estriado. El otro tipo estaba formado por neuronas más grandes y con un marcaje más intenso. Las neuronas pobremente teñidas del estriado humano se consideran neuronas de proyección atendiendo a su morfología y su elevado número, mientras que aquéllas de tamaño mediano y grande con un marcaje bien definido, han sido identificadas como interneuronas en trabajo previos (Prensa y cols., 1998; Cicchetti y cols., 2000). Por lo tanto, este estudio se ha centrado en el análisis de las características morfológicas, distribución, y organización compartimental del segundo tipo descrito.

##### 4.4.1. Características morfológicas

Las interneuronas inmunorreactivas frente a CB presentaron un soma mediano similar al de las interneuronas nitrérgicas, más grande que el de las neuronas de proyección, pero más pequeño que el de las interneuronas colinérgicas. Su tinción y morfología les hacía claramente distinguibles de las neuronas de proyección, aunque la intensidad del marcaje inmunohistoquímico no era igual en toda esta población de interneuronas. En cualquier caso, incluso aquellas interneuronas que presentaban un marcaje más débil se pudieron diferenciar claramente de las neuronas de proyección.

Todo ello nos llevó a analizar a las interneuronas CB positivas en su conjunto sin tener en cuenta la intensidad del marcaje.

El diámetro del soma oscilaba entre las 12 y las 25  $\mu\text{m}$ . Su morfología era variable, siendo habitualmente ovoide, fusiforme o triangular (Figuras 31 y 32). Del cuerpo neuronal solían emerger entre 2 y 4 dendritas primarias de grosor medio, que se extendían una gran distancia y daban lugar a algunas ramificaciones más finas. En general, el árbol dendrítico de estas interneuronas no era demasiado denso. Como en el caso de las interneuronas colinérgicas, la gran variedad morfológica de estas neuronas impidió su clasificación en grupos independientes, por lo que se procedió al análisis cuantitativo del tamaño del soma. En esta ocasión, por medio del *nucleator* se calculó el volumen del soma de 535 neuronas CB positivas, distribuidas por todo el estriado. El volumen medio total de estas interneuronas fue  $1183 \pm 25 \mu\text{m}^3$ . Los datos del volumen neuronal en cada región aparecen en la Tabla 11, y en el gráfico de la Figura 34.

**Tabla 11. Valor medio del volumen del soma de las interneuronas CB positivas en las distintas regiones del estriado humano**

	<i>Cabeza precom.</i>	<i>Cabeza postcom.</i>	<i>Cuerpo</i>	<i>Giro</i>	<i>Cola</i>	<i>Putamen precom.</i>	<i>Putamen postcom.</i>
<b>Volumen<sup>1</sup></b>	1233 $\pm$ 51	1126 $\pm$ 74	1008 $\pm$ 112	1266 $\pm$ 98	759 $\pm$ 118	1297 $\pm$ 56	1081 $\pm$ 44
<b>n</b>	148	58	24	33	7	128	137

<sup>1</sup>El volumen se expresa en  $\mu\text{m}^3$ , y se indica el valor de la media  $\pm$  SEM. n indica el número de neuronas medidas en cada región. *postcom.*, *postcomisural*; *precom.*, *precomisural*.

Con el objetivo de saber si existían diferencias estadísticas entre estos valores, se aplicó la prueba estadística *ANOVA* con *Tukey B* como prueba a posteriori, debido a la homogeneidad de las varianzas. Los resultados mostraron que había diferencias muy significativas entre las distintas regiones ( $P=0,009$ ).

#### Test of Homogeneity of Variances

Volume			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,211	6	528	,299



## ANOVA

Volume

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5858173	6	976362,231	2,872	,009
Within Groups	1,80E+08	528	340001,817		
Total	1,85E+08	534			

## Volume

Region	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Tukey B <sup>a,b</sup> Tail	7	759,0000	
Body	24	1008,0000	1008,0000
Postc Put	137	1080,6058	1080,6058
Postc Head	58	1126,2931	1126,2931
Prec Head	148		1232,5068
Gyrus	33		1266,1515
Prec Put	128		1296,5703

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 27,566.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Como se observa en la salida de la prueba de *Tukey B*, los volúmenes de las distintas regiones forman dos grupos distintos: uno en el que se incluyen la cola, el cuerpo, la cabeza postcomisural del núcleo caudado y el putamen postcomisural; y otro en el que aparecen todas las regiones salvo la cola del núcleo caudado. Esto indica que las diferencias estadísticas más llamativas aparecen entre el putamen precomisural y la cola del núcleo caudado, siendo mayor el volumen de las neuronas situadas en la primera. El resto de las regiones del estriado tienen valores muy similares, aunque el cuerpo y la cabeza postcomisural del núcleo caudado, y el putamen postcomisural tienen unos valores más próximos a los de la cola del núcleo caudado que a los del putamen precomisural.

También se analizaron los valores correspondientes al volumen del soma en los distintos cerebros incluidos en este estudio y, aunque aparecieron diferencias estadísticas entre ellos, no se observó una especial influencia de la edad. Estas diferencias parecían debidas a la habitual variación interindividual.

#### 4.4.2. Distribución a lo largo de los ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral

En aquellos cortes correspondientes a las distintas regiones del estriado en los que se dibujó la distribución de las interneuronas CB, se observó a primera vista que la presencia de este grupo neuronal era mucho menor que el de los dos expuestos anteriormente (Figura 33). Las interneuronas parecían ocupar especialmente las regiones postcomisurales del núcleo caudado y del putamen, con preferencia por el sector dorsolateral del putamen. Es interesante señalar que las de este último sector estaban teñidas intensamente, mientras que las del núcleo caudado, si bien fueron identificadas sin problema como interneuronas, no presentaban un marcaje tan definido.

Estas observaciones preliminares fueron confirmadas por medio del análisis estereológico. En este caso, se emplearon los mismos cerebros que en el estudio de la distribución de las interneuronas nitrérgicas (casos 1-6 de la Tabla 1), aunque el caso 2 fue descartado del estudio al no presentar un marcaje inmunohistoquímico adecuado. El análisis estadístico de los datos reveló que las interneuronas CB inmunorreactivas seguían una distribución bastante homogénea a lo largo de todo el estriado. Aun así, aparecieron algunas diferencias. La región más densamente poblada fue el cuerpo del núcleo caudado, seguido de la cabeza postcomisural, el giro, el putamen postcomisural y la cola del núcleo caudado, todos ellos con unos valores parecidos. La cabeza precomisural del núcleo caudado y el putamen precomisural presentaban una densidad claramente inferior (Figura 34). Un resumen de los datos obtenidos tras la aplicación del disector óptico se muestra en la Tabla 12.

**Tabla 12. Valores medios de la densidad de las neuronas CB inmunorreactivas (neuronas/mm<sup>3</sup>) en las distintas regiones y sectores en los que se dividió el estriado humano<sup>1</sup>**

	<i>dm</i>	<i>dl</i>	<i>vm</i>	<i>vl</i>	<i>Total</i>
Cabeza precom.	129 ± 23	99 ± 15	85 ± 14	57 ± 11	95 ± 13
Cabeza postcom.	276 ± 94	192 ± 38	186 ± 76	116 ± 50	188 ± 58
Cuerpo					201 ± 71
Giro	<i>Dorsal</i>		<i>Ventral</i>		
	193 ± 63		211 ± 67		179 ± 46
Cola					145 ± 58

Putamen precom.	62 ± 10	86 ± 12	52 ± 15	73 ± 12	69 ± 9
Putamen postcom.	153 ± 29	241 ± 28	83 ± 16	154 ± 24	163 ± 20

<sup>1</sup>Para cada uno de estos sectores, se indica la media ± error estándar de la media de la densidad. dl, dorsolateral; dm, dorsomedial; postcom., postcomisural; precom., precomisural; vl, ventrolateral; vm, ventromedial.

Los valores obtenidos en cada una de las regiones en las que fue dividido el estriado se compararon por medio de la prueba estadística *ANOVA* con *Tamhane* como prueba a posteriori, debido a la heterogeneidad de las varianzas. La primera de las pruebas fue ligeramente significativa ( $P=0,043$ ), por lo que se concluyó que la diferencia en la distribución neuronal entre las distintas regiones era mínima.

#### Test of Homogeneity of Variances

Density Prec Head

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10,095	6	167	,000

#### ANOVA

Density Prec Head

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	404087,4	6	67347,903	2,231	,043
Within Groups	5041221	167	30186,954		
Total	5445309	173			

La prueba estadística a posteriori reveló que esta diferencia aparecía cuando se comparaba el putamen precomisural con el postcomisural, siendo estadísticamente muy significativa ( $P=0,003$ ). En este sentido, conviene añadir que la probabilidad asociada al comparar la cabeza postcomisural, el cuerpo, el giro, la cola del núcleo caudado y el putamen postcomisural entre ellos tenía un valor de 1,000, lo cual demuestra la similitud de las medias. Este hecho se puede comprobar igualmente en la Tabla 13, donde se presentan las diferencias entre los valores medios de la densidad en las distintas regiones, y su significación estadística.

**Tabla 13. Diferencia de las medias de las densidades de las interneuronas CB inmunorreactivas en las distintas regiones del estriado<sup>1</sup>**

		NC					Put	
		Cabeza precomisural	Cabeza Postcomisural	Cuerpo	Giro	Cola	Precomisural	Postcomisural
NC	Cabeza precom.		-94	-106	-84	-51	25	-69
	Cabeza postcom.	94		-12	10	43	119	25
	Cuerpo	106	12		22	55	132	37
	Giro	84	-10	-22		33	109	15
	Cola	51	-43	-55	-33		76	-18
Put	Precomisural	-25	-119	-132	-109	-76		-94 **
	Postcomisural	69	-25	-37	-15	18	94 **	

<sup>1</sup> \*\*indica diferencias estadísticamente muy significativas ( $P < 0,01$ ). NC, núcleo caudado; Put, putamen

Como puede observarse en estos datos, existe un gran aumento en la densidad neuronal al pasar de los territorios precomisurales a los postcomisurales. Para evaluar este aumento, se comparó el estriado precomisural con el postcomisural por medio de la prueba *U* de *Mann-Whitney*, y se obtuvieron diferencias significativas, si bien no de gran relevancia ( $P=0,041$ ). Sin embargo, la comparación directa de las medias ofrecía unas diferencias considerables: el estriado postcomisural tenía una densidad 2,1 veces mayor que el precomisural (Figura 35). Al analizar los territorios precomisurales y postcomisurales del núcleo caudado, no se apreciaron diferencias estadísticas en cuanto a su densidad neuronal (*U* de *Mann-Whitney*,  $P=0,938$ ), siendo 1,9 veces superior en el segundo (Figura 35). En el putamen, como ya revelara la prueba *ANOVA* citada anteriormente, existían diferencias muy significativas entre los dos territorios, que fueron refrendadas por la prueba *t* de *Student* ( $P<0,001$ ) (Figura 35), que fue empleado a causa de la distribución normal de las muestras. En este caso, el putamen postcomisural mostraba una densidad de interneuronas CB positivas 2,4 veces mayor que el precomisural.

Sin embargo, la densidad interneuronal en el núcleo caudado no mostraba un aumento lineal según se avanzaba en el eje anteroposterior (Figura 34). El máximo se alcanzó en el cuerpo del núcleo caudado, pero la densidad disminuyó en el giro y en la cola de este núcleo. En cuanto a las diferencias entre el núcleo caudado y el putamen, no fueron estadísticamente significativas (*U* de *Mann-Whitney*,  $P=0,337$ ). El núcleo caudado tenía una densidad 1,3 veces mayor que el putamen. Esta diferencia fue

sensiblemente mayor en el territorio precomisural (1,4) que en el postcomisural (1,1). A la hora de comparar la densidad neuronal entre los distintos cerebros, los casos 3, 4, 5 y 6 tenían unos valores muy similares. El caso 1, el más joven, presentaba una densidad neuronal mayor, aunque de estos datos no se puede concluir que la densidad de las interneuronas CB positivas disminuya con la edad.

Con respecto a la distribución de estas interneuronas en el eje dorsoventral y mediolateral, se aplicó una prueba *ANOVA* con *Tamhane* como prueba a posteriori para comparar los cuatros sectores en los cuales algunas de las regiones habían sido divididas. Además, se llevó a cabo la prueba estadística *U* de *Mann-Whitney* para comparar las mitades dorsales y ventrales, así como las mediales y laterales (Figura 35).

La densidad neuronal en estos sectores en el núcleo caudado fue bastante homogénea. Pese a ello, en la cabeza precomisural se encontraron diferencias significativas al comparar los cuatro sectores ( $P=0,022$ ). La prueba a posteriori reveló que esta significación se debía a las diferencias entre el sector dorsomedial y el ventrolateral (Tabla 12, Figura 35), teniendo el primero una densidad 2,3 veces mayor que el segundo. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre las mitades dorsal y ventral, ni entre las correspondientes medial y lateral ( $P=0,059$  y  $P=0,376$ , respectivamente). En la cabeza postcomisural del núcleo caudado, no se encontraron diferencias en ninguna de las pruebas llevadas a cabo aunque, como se puede ver en la Figura 35, la distribución neuronal en los distintos sectores era muy similar a la encontrada en la cabeza precomisural. La diferencia entre la mitad dorsal y la ventral en el giro del núcleo caudado fue todavía más pequeña. En este caso, la mitad ventral apenas tenía una densidad 1,1 veces mayor que la dorsal, sin encontrarse diferencias estadísticas entre ambas.

La homogeneidad con la que las interneuronas CB positivas parecían distribuirse en las regiones del núcleo caudado desapareció en el putamen. En el territorio precomisural de este último núcleo, no se encontraron diferencias estadísticas cuando fueron comparados los cuatro sectores ( $P=0,23$ ) y las mitades dorsal y ventral ( $P=0,251$ ), aunque hubo diferencias muy significativas ( $P<0,001$ ) al comparar la mitad medial con la lateral. Como puede verse en la Figura 35, esta diferencia es a favor de la mitad lateral, que contaba con una densidad 2,2 veces mayor que la mitad medial. En el putamen postcomisural, la heterogeneidad en la distribución de estas interneuronas fue aún mayor. La prueba estadística *ANOVA* reveló diferencias muy significativas

( $P < 0,001$ ), que aparecieron al comparar el sector dorsolateral con el ventromedial (*Tamhane*,  $P < 0,001$ ) (Figura 35). Como se puede observar en la Tabla 12, el sector dorsolateral del putamen postcomisural y el dorsomedial de la cabeza postcomisural del núcleo caudado son los más densamente poblados de todos los sectores y regiones estriatales. Además, en el putamen postcomisural se encontraron diferencias significativas entre la mitad dorsal y la ventral ( $P = 0,017$ ), y muy significativas entre la medial y la lateral ( $P = 0,004$ ), siendo más densamente pobladas la mitad dorsal y la lateral de esta estructura estriatal (Figura 35).

En resumen, las interneuronas CB positivas abundan en las regiones postcomisurales del núcleo caudado y del putamen. Además, tienden a concentrarse en el sector dorsomedial del núcleo caudado, y en el dorsolateral del putamen. En la Figura 36 se muestra un esquema tridimensional resaltando las zonas estriatales más densamente pobladas por este tipo de interneuronas.

#### *4.4.3. Organización con respecto al compartimento estriosomal*

La organización compartimental de las interneuronas CB positivas se analizó por medio de cortes adyacentes procesados con las técnicas inmunohistoquímicas de la ENK y de la CB. En total, se dibujaron y estudiaron 112 estriosomas distribuidos de la siguiente manera: 27 en la cabeza precomisural, 14 en la cabeza postcomisural, 18 en el cuerpo y 12 en el giro del núcleo caudado; 15 en el putamen precomisural y 26 en el postcomisural. Las características de la relación de estos estriosomas con las interneuronas fueron cuantificadas en la Tabla 14.

En la cabeza precomisural del núcleo caudado, aproximadamente la mitad de los estriosomas analizados tenían relación con las interneuronas CB positivas. Éstas solían encontrarse en las zonas ENK positivas de la periferia estriosomal o de los estriosomas homogéneos (Figura 37). Sin embargo, no aparecieron en el centro estriosomal. Debido al bajo número de estas interneuronas en cada corte, la densidad neuronal en el interior de los estriosomas era similar a la encontrada en la matriz. Normalmente aparecían entre 2 y 4 somas en el interior de los estriosomas que contenían estas interneuronas (Figura 37). En cuanto a las interneuronas presentes en los bordes estriosomales, se encontró una importante diferencia entre los estriosomas estudiados en la porción anterior de la cabeza precomisural del núcleo caudado, y aquéllos de su porción posterior. En los

primeros era más habitual encontrar interneuronas en los bordes que en los segundos, tanto en el límite matriz/estriosoma como en el centro/periferia. Sin embargo, dado que la técnica de estudio que utilizamos para estas células estriatales fue la de los cortes adyacentes, no pudimos precisar con absoluta certeza la localización de estos bordes. Teniendo en cuenta los estriosomas en los que se encontraron interneuronas dudosas en cuanto a su localización en esos límites, los valores entre la porción anterior y la porción posterior de la cabeza precomisural estarían más equilibrados. En cualquier caso, tanto en la Tabla 14 como en la Figura 39 se presentan los valores de los estriosomas estudiados en la cabeza precomisural del núcleo caudado, sin atender a su localización anteroposterior.

En la cabeza postcomisural del núcleo caudado sólo se encontró un estriosoma con una interneurona en su interior, que curiosamente estaba situada en el centro pobre en ENK de un estriosoma heterogéneo (Figura 37). Pese a que la cabeza postcomisural del núcleo caudado era una de las regiones con una mayor densidad interneuronal, apenas se encontraron neuronas en relación con los estriosomas de ella. Concretamente, no se encontró ninguna en los bordes estriosomales, y el número de interneuronas dudosas en cuanto a su localización en los mismos también fue bastante bajo. Teniendo en cuenta la escasa densidad de estas neuronas en el estriado, no es extraño encontrar un número relativamente bajo de estriosomas con neuronas en la matriz que los circunda. En este caso, los valores fueron similares a los hallados en la cabeza precomisural del núcleo caudado.

En el cuerpo de este núcleo volvieron a encontrarse entre 1 y 3 interneuronas en el interior de los estriosomas, tanto en el centro pobre en ENK como en las zonas ricas en este neuropéptido (Figura 37). En alguno de los casos, la cantidad de somas en el interior del estriosoma era superior a la observada en la matriz que lo rodeaba. No se encontraron apenas interneuronas en los bordes de los distintos compartimentos, aunque la cantidad de interneuronas dudosas era similar a la hallada en otras regiones estriatales.

En el giro del núcleo caudado también se encontraron interneuronas en el interior de algunos de los estriosomas, aunque tanto el número de estriosomas con esta característica como el de somas hallados en ellos fueron muy bajos (Figura 38). Sin embargo, los estriosomas con neuronas en los bordes fueron relativamente frecuentes, casi en el mismo grado que en aquellas zonas que presentaron los valores máximos.

Como nota curiosa, en el giro del núcleo caudado es donde se encontró un mayor número de estriosomas con interneuronas en la matriz circundante.

En el putamen, la cantidad de estriosomas que establecían alguna relación de cualquier tipo con las interneuronas fue mayor que en el núcleo caudado. En su región precomisural, se encontraron somas tanto en el centro estriosomal como en las zonas ricas en ENK en algunos de los estriosomas, llegando a contener entre 1 y 5 neuronas. Además, se observaron algunas interneuronas en los límites de los distintos compartimentos (Figura 38). El putamen postcomisural fue la región estriatal en la que se encontró una mayor relación entre las interneuronas CB positivas y los estriosomas. Los somas aparecieron tanto en las zonas ricas en ENK como en las que carecían de este neuropéptido, y abundaron en los bordes de los distintos compartimentos, especialmente entre la matriz y el estriosoma. Fueron especialmente los estriosomas heterogéneos los que presentaron una mayor relación con este tipo de interneuronas (Figura 38).

A continuación, en la Tabla 14 se detallan los distintos parámetros cuantificados para los estriosomas de las regiones estriatales analizadas. Estos datos también están representados en la gráfica de la Figura 39. Además, en la Figura 40 se muestra un esquema tridimensional de la organización compartimental de estas interneuronas.

**Tabla 14. Estudio cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas CB inmunorreactivas**

<i>Estriosomas</i>		<i>Con neuronas en el interior</i>		<i>Con neuronas en el borde</i>		<i>Sin relación con neuronas</i>	
		ENK +	ENK -	Matriz/estr.	Centro/perif.	Homogéneo	Heterogéneo
Cabeza precom.	n = 27 (22/5) <sup>1</sup>	10/27 (37%)	0/5 (0%)	7/27 (26%)	2/5 (40%)	12/22 (55%)	2/5 (40%)
Cabeza postcom.	n = 14 (10/4)	0/14 (0%)	1/4 (25%)	0/14 (0%)	0/4 (0%)	10/10 (100%)	3/4 (75%)
Cuerpo	n = 18 (16/2)	7/18 (39%)	1/2 (50%)	3/18 (17%)	0/2 (0%)	10/16 (62%)	1/2 (50%)
Giro	n = 12 (12/0)	2/12 (17%)	-	5/12 (42%)	-	7/12 (58%)	-
Putamen precom.	n = 15 (8/7)	4/15 (27%)	1/7 (14%)	7/15 (47%)	1/7 (14%)	3/8 (37%)	2/7 (29%)
Putamen postcom.	n = 26 (14/12)	11/26 (42%)	3/12 (25%)	14/26 (54%)	3/12 (25%)	9/14 (64%)	1/12 (8%)

<sup>1</sup>n representa el número de estriosomas analizados en cada región (homogéneos/con centro y periferia).

Cada dato de la tabla representa el número de estriosomas que cumplieron las características mencionadas, indicándose el porcentaje respecto a los estriosomas (homogéneos, heterogéneos, o todos) estudiados en esa región. ENK, encefalina; estr., estriosoma; perif., periferia; postcom., postcomisural; precom., precomisural.



#### ***4.5. Comparaciones entre los tres grupos de interneuronas***

En este apartado se detallan los resultados obtenidos al comparar los tres grupos interneuronales entre sí. En cuanto a la morfología, apenas hay lugar para la comparación. El dato cuantificado en este aspecto, el volumen del soma, fue medido exhaustivamente en las neuronas colinérgicas y CB positivas, mientras que en el caso de las neuronas nitrérgicas se halló el volumen de cada tipo morfológico con un menor número de datos comparado con el de los otros dos grupos. Como era de esperar, el volumen de las interneuronas colinérgicas fue mucho mayor que el de las otras dos en todas las regiones del estriado. Por otra parte, el volumen del soma de las neuronas nitrérgicas y el de las CB positivas era similar, aunque el menor número de datos en las primeras hace imposible establecer una comparación fiable. En los otros dos aspectos analizados en los distintos grupos, la distribución y la organización compartimental, se encontraron las diferencias y similitudes que se explican a continuación.

##### ***4.5.1. Prevalencia en las distintas regiones y sectores del estriado***

Como se deduce de los resultados expuestos anteriormente, las interneuronas nitrérgicas son más abundantes que las colinérgicas y las CB positivas en el estriado humano (Figura 41). En total, su proporción es aproximadamente 10:5:2, siendo la densidad de las nitrérgicas el doble de la de las colinérgicas y cinco veces la de las CB positivas. Por otra parte, las colinérgicas son aproximadamente 2,5 veces más abundantes que las interneuronas CB inmunorreactivas. Esta relación también se muestra en la Figura 42, donde además se indica que las diferencias entre las medias de las densidades de los distintos grupos son muy significativas. Este patrón aparece en la mayoría de las regiones y de los sectores estriatales, especialmente en las regiones anteriores. Sin embargo, en algunas zonas postcomisurales aparecen ligeras variaciones en la prevalencia de los tres grupos interneuronales, como se detalla a continuación.

En el cuerpo del núcleo caudado, aunque la proporción era muy parecida a la del total estriatal, la diferencia estadística entre la densidad de las interneuronas nitrérgicas y la de las colinérgicas se redujo (*ANOVA* y *Tamhane*;  $P=0,022$ ) (Figura 42). En el giro del núcleo caudado, por el contrario, la relación entre las nitrérgicas y las colinérgicas fue mayor que el valor total (6:2:1), y las diferencias estadísticas entre las colinérgicas y

las CB positivas fueron menores (*ANOVA* y *Tamhane*;  $P=0,016$ ) (Figura 42). Aun así, las diferencias en estas regiones no sufrieron grandes cambios con respecto a los valores totales, y la proporción en cada una de las regiones fue similar a la total. La región donde se encontraron cambios llamativos fue la cola del núcleo caudado, en donde no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (Figura 42). En este territorio, la proporción era 6:3:1. En el putamen postcomisural, se mantuvieron las diferencias muy significativas entre las interneuronas CB positivas y los otros dos grupos neuronales. Sin embargo, entre las nitrérgicas y las colinérgicas sólo se hallaron diferencias significativas (Figura 42). La proporción entre los tres grupos en esta región fue 8:3:2.

Dentro de cada región, se estudió la relación entre la densidad de los distintos grupos neuronales según el sector que ocupaban. En este caso, se encontraron algunos datos llamativos en la cabeza precomisural y postcomisural y en el giro del núcleo caudado, y en el putamen postcomisural (Figuras 43 y 44). En los sectores mediales de la cabeza precomisural del núcleo caudado, la diferencia entre las densidades de las neuronas nitrérgicas y colinérgicas disminuyó considerablemente, hasta el punto de perder su significación estadística en el sector dorsomedial. Como puede verse en la Figura 43, la densidad de ambos grupos era prácticamente igual. Aunque este hecho no sea tan evidente en el sector ventromedial, las ligeras diferencias estadísticas muestran que la densidad de las neuronas nitrérgicas no difiere tanto de la de las colinérgicas como en otros sectores (*ANOVA* y *Tamhane*;  $P=0,041$ ). En la cabeza postcomisural, este acercamiento de las densidades es patente no sólo en los sectores mediales, sino también en el ventrolateral (Figura 43). Tanto en el sector dorsomedial como en el ventromedial, no se encontraron diferencias estadísticas entre las neuronas nitrérgicas y las colinérgicas. En el sector ventrolateral, aunque estas diferencias aparecieron, tenían una ligera significación estadística (*ANOVA* y *Tamhane*;  $P=0,049$ ). En el giro del núcleo caudado, la densidad de las neuronas colinérgicas se aproximó a la de las CB positivas, no llegando a encontrarse diferencias estadísticas entre ellas ni en la mitad dorsal ni en la ventral (Figura 44). Este hecho ocurrió también en el sector dorsolateral del putamen postcomisural, lo cual no sorprende si se tiene en cuenta que en esta zona las interneuronas CB positivas aparecen en gran número (Figura 44).

En resumen, las neuronas nitrérgicas fueron claramente más abundantes que las colinérgicas, y éstas que las CB positivas. Sin embargo, las diferencias entre ellas no

fueron constantes a lo largo de los ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral del estriado. En concreto, en el sector dorsomedial de la cabeza precomisural del núcleo caudado, la diferencia entre la densidad de las neuronas nitrérgicas y la de las colinérgicas alcanzó su mínimo. Por otra parte, las interneuronas calbindina positivas alcanzaron valores muy similares a los de las colinérgicas en el putamen postcomisural, especialmente en su sector dorsolateral. En la Figura 45 se muestra un esquema tridimensional que pone de manifiesto aquellas zonas del estriado que cuentan con una mayor densidad neuronal, teniendo en cuenta los tres grupos de interneuronas analizados en este estudio.

#### *4.5.2. Diferencias en la organización compartimental*

En este apartado se resumen las diferencias encontradas entre los tres grupos distintos de interneuronas en cuanto a su posición con respecto a los estriosomas. Como se muestra en las Figuras 46 y 47, se compararon los datos de las Tablas 6, 10 y 14 en las distintas regiones estriatales incluidas en este estudio.

En la cabeza precomisural del núcleo caudado, la gran diferencia en cuanto a la organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas radicó en la mayor ocupación de las primeras del centro estriosomal (Figura 46). Además, la proporción de estriosomas homogéneos sin interneuronas nitrérgicas fue claramente mayor que la de aquéllos que carecían de interneuronas colinérgicas. Con respecto a las interneuronas calbindina positivas, no se encontró ningún soma en el centro estriosomal en esta región del núcleo caudado. Además, la proporción de estriosomas sin relación con estas interneuronas fue más alta que la de los otros dos grupos neuronales.

En la cabeza postcomisural del núcleo caudado, la presencia de las neuronas nitrérgicas en el centro estriosomal siguió siendo mayor que la de las neuronas colinérgicas (Figura 46). Sin embargo, éstas fueron mucho más numerosas en la matriz que circundaba a los estriosomas y en los límites entre los distintos compartimentos. Las neuronas CB positivas apenas aparecieron en contacto con los estriosomas, aunque su presencia en el centro estriosomal era mayor que la de las neuronas colinérgicas (Figura 46). Aunque estos resultados no se muestran en la Figura, estas neuronas eran algo más abundantes en la matriz circundante que las neuronas nitrérgicas.

En el cuerpo del núcleo caudado, se encontró una mayor proporción de estriosomas con neuronas colinérgicas que con cualquiera de los otros dos tipos (Figura 46). Aún así, la presencia de las interneuronas CB positivas tanto en el centro como en la periferia estriosomal fue importante teniendo en cuenta su baja densidad celular. Por el contrario, las neuronas nitrérgicas fueron más abundantes tanto en el borde estriosomal como en la matriz que circundaba a los estriosomas (Figura 46).

En el giro del núcleo caudado, los estriosomas abundaban en neuronas nitrérgicas y CB positivas, mientras que se veían desprovistos de interneuronas colinérgicas. Éstas aparecían únicamente en la matriz circundante a algunos estriosomas (Figura 46).

En el putamen precomisural, había más estriosomas con neuronas colinérgicas que con nitrérgicas o inmunorreactivas frente a CB (Figura 47). Sin embargo, las neuronas nitrérgicas aparecían frecuentemente en el borde entre la matriz y los estriosomas, siendo las colinérgicas más abundantes en el límite entre el centro y la periferia. La presencia de las neuronas CB positivas era baja en las distintas localizaciones, aunque aumentaba en el borde entre la matriz y los estriosomas (Figura 47).

Por último, en el putamen postcomisural los estriosomas contenían numerosas neuronas nitrérgicas en sus distintas localizaciones, salvo en el centro pobre en ENK (Figura 47). En esta localización, la presencia de neuronas colinérgicas era mayor. Las neuronas CB positivas no aparecían especialmente en ninguna localización, pero su presencia era algo más frecuente en el interior rico en ENK de los estriosomas, y en el borde entre la matriz y el compartimento estriosomal. Los tres grupos neuronales abundaban en la matriz circundante de esta región estriatal.

En resumen, las neuronas nitrérgicas aparecían en el interior estriosomal con más frecuencia que los otros dos grupos neuronales en todas las regiones estriatales salvo en el cuerpo del núcleo caudado y en el putamen precomisural. De hecho, las interneuronas colinérgicas parecían ocupar preferentemente el interior de los estriosomas del putamen. Curiosamente, los bordes de los estriosomas parecían estar ocupados principalmente por las neuronas nitrérgicas, salvo en la cabeza postcomisural del núcleo caudado, donde las interneuronas colinérgicas abundaban en los límites entre los distintos compartimentos. Finalmente, las interneuronas CB positivas seguían una

---

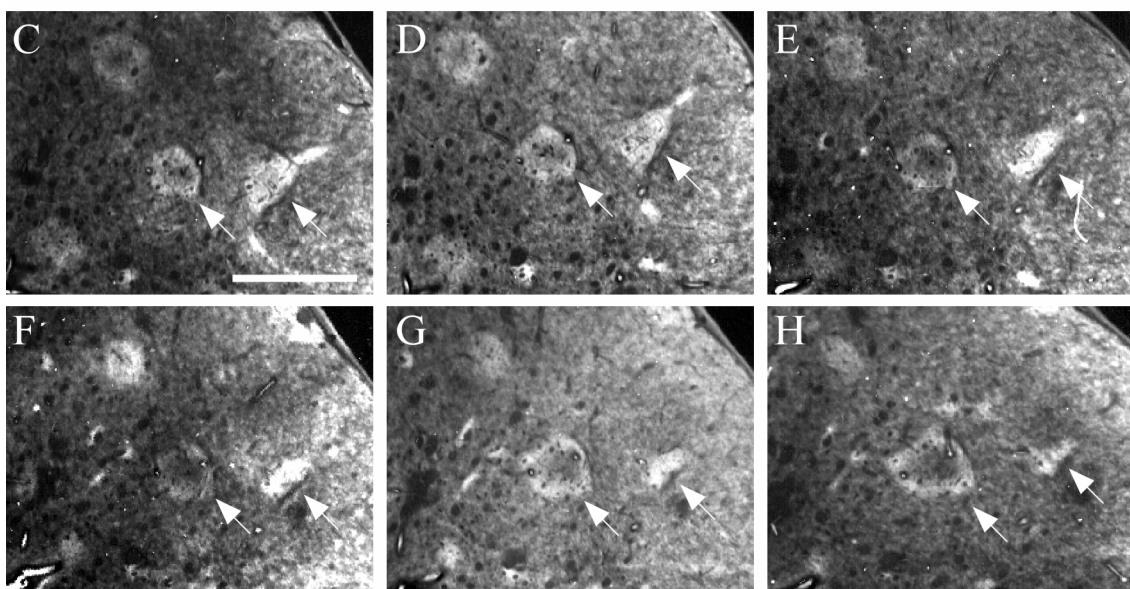
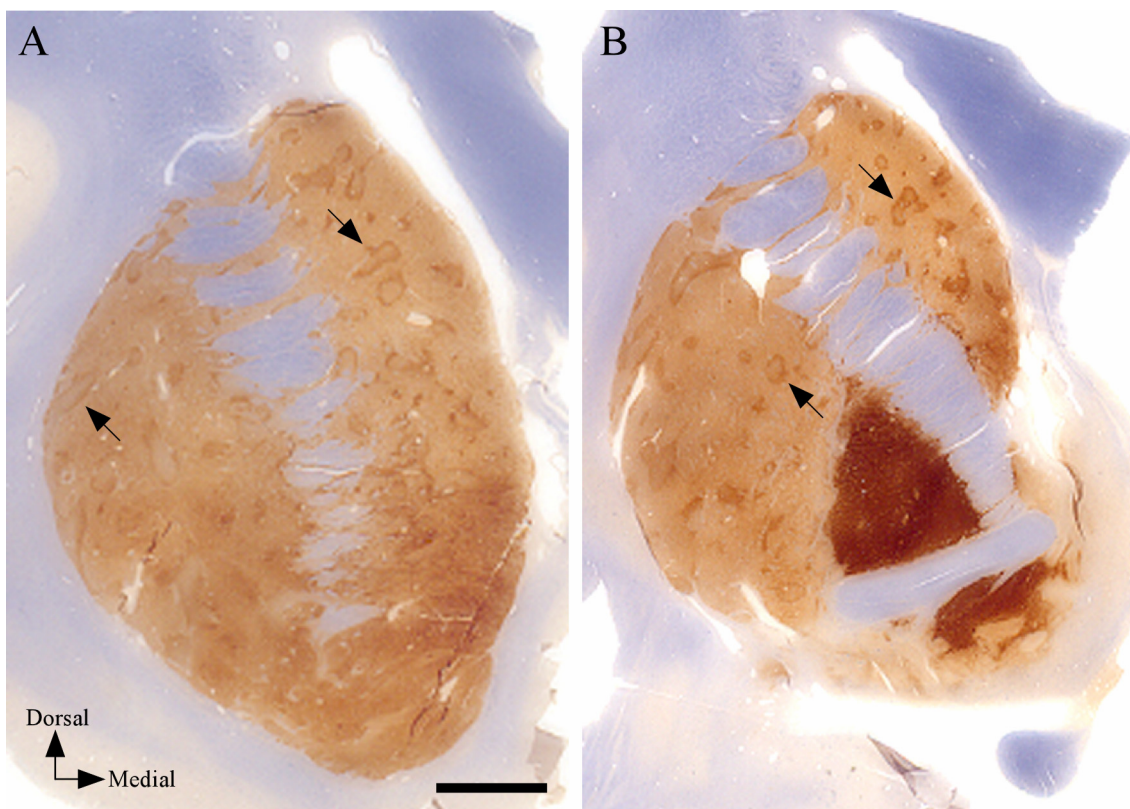
organización compartimental bastante homogénea en las distintas regiones estriatales, sin mostrar una preferencia clara por ninguna localización relacionada con los estriosomas. En la Figura 48 se muestra un esquema tridimensional que ilustra la organización compartimental de los tres grupos de interneuronas analizados en este estudio, tanto en el núcleo caudado como en el putamen.



**FIGURA 5**

**Figura 5. Anatomía química del estriado anterior.** Los cortes presentados en **A** y **B** fueron tratados para la visualización de la NADPH-diaforasa y la encefalina, que revela la presencia de numerosos estriosomas divididos en centro y periferia (pobres o ricos en encefalina, respectivamente). Las flechas indican algunos ejemplos de estos estriosomas. En **C-H** aparece una serie de impresiones directas obtenidas en seis cortes adyacentes tratados para la visualización de la encefalina, y separados 50  $\mu\text{m}$ . Uno de los estriosomas señalados está dividido en centro y periferia, y su morfología apenas cambia en la serie. El otro es homogéneo, y su tamaño se reduce progresivamente hasta casi desaparecer en el último de los cortes. En ambos casos, las variaciones morfológicas son mínimas en cortes adyacentes. **Barras de calibración:** 5 mm (A y B) y 250  $\mu\text{m}$  (C-H).

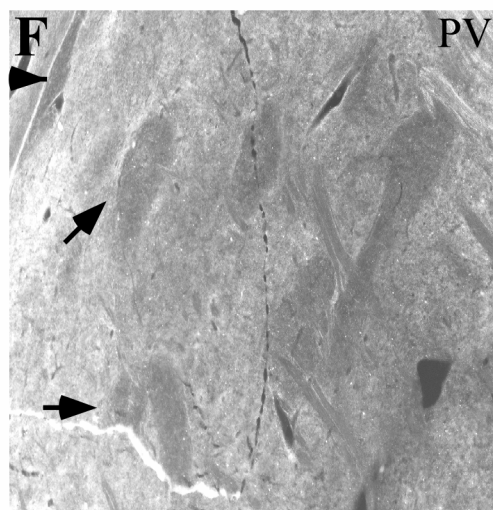
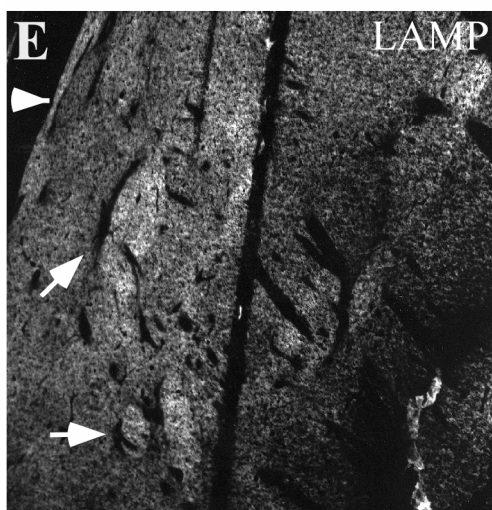
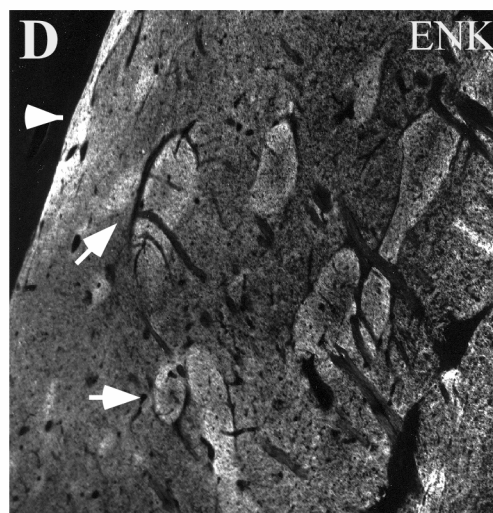
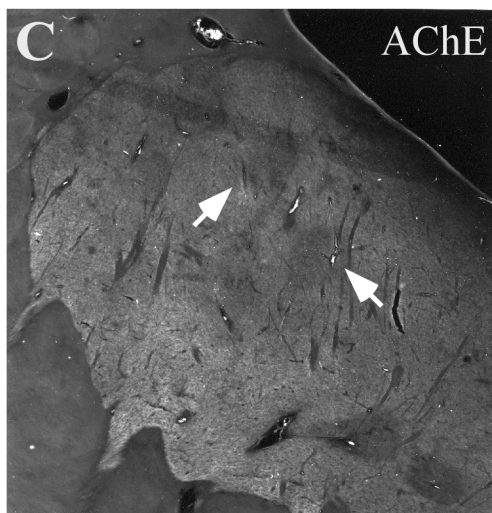
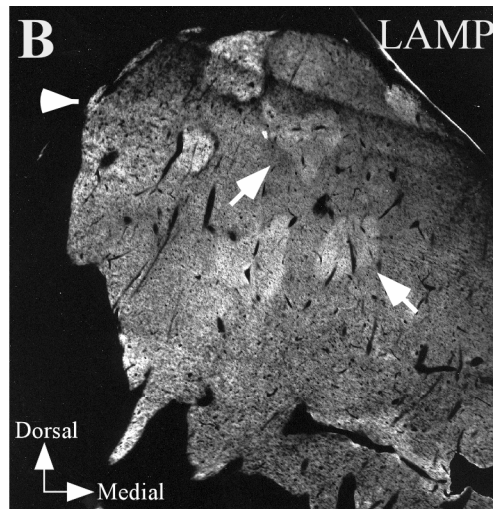
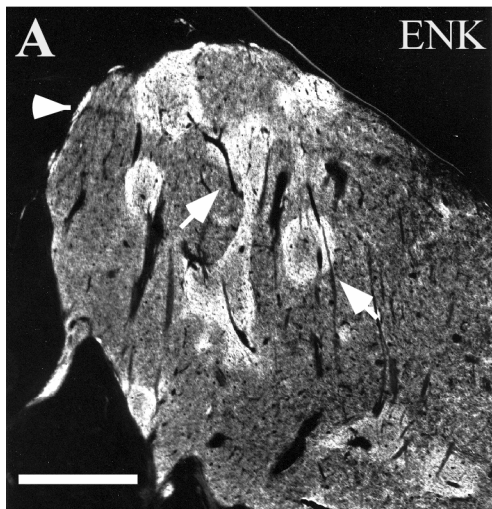






**FIGURA 6**

**Figura 6. El compartimento estriosomal en el estriado posterior.** Serie de impresiones directas que muestran la presencia de estriosomas homogéneos y heterogéneos en el cuerpo del núcleo caudado (**A-C**) y en el tercio posterior del putamen postcomisural (**D-F**). Los cortes fueron procesados para la visualización de ENK (**A y D**), LAMP (**B y E**), AChE (**C**) y PV (**F**). Las flechas señalan los mismos estriosomas en la serie **A-C**, y **D-F**. Las cabezas de flecha indican los bordes dorsomedial del núcleo caudado y lateral del putamen, que presentaban un marcaje similar al del compartimento estriosomal. **Abreviaciones:** *AChE*, acetilcolinesterasa; *ENK*, encefalina; *LAMP*, proteína de membrana asociada al sistema límbico; *PV*, parvalbúmina. **Barra de calibración:** 2,5 mm.

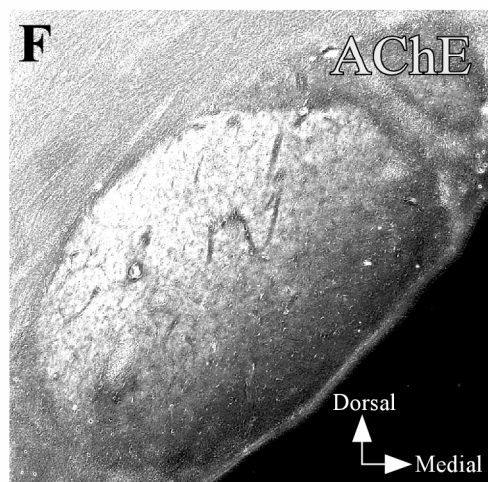
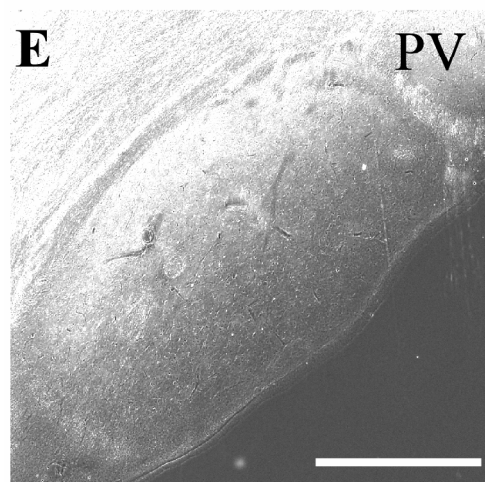
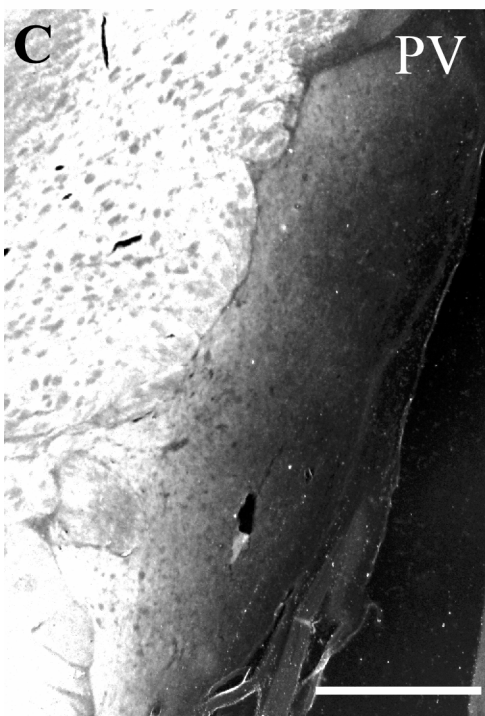
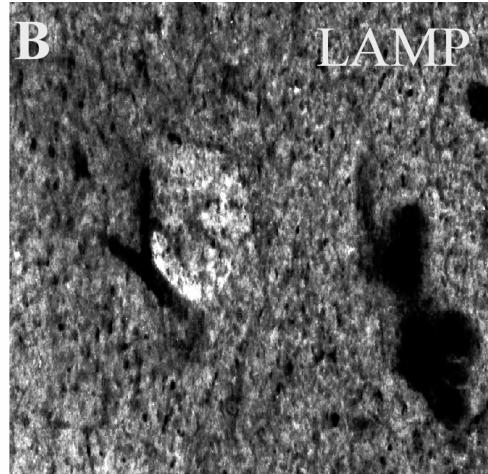
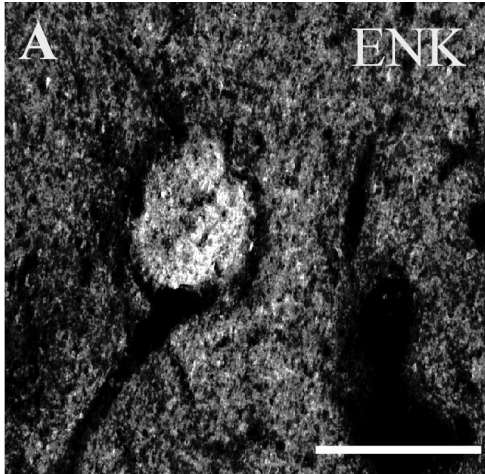




**FIGURA 7**

**Figura 7. Estriosomas y gradientes de marcaje en el estriado posterior.** Impresiones directas que muestran, por una parte, un estriosoma encontrado en el giro del núcleo caudado, y revelado con ENK (**A**) y LAMP (**B**). Por otra, se ilustra la presencia de un gradiente creciente en el marcaje del neuropilo con PV y AChE, que discurre desde el territorio dorsomedial hasta el ventrolateral en el giro del núcleo caudado (**C** y **D**), y en sentido inverso en la cola de dicho núcleo estriatal (**E** y **F**). **Abreviaciones:** *AChE*, acetilcolinesterasa; *ENK*, encefalina; *LAMP*, proteína de membrana asociada al sistema límbico; *PV*, parvalbúmina. **Barras de calibración:** 200  $\mu$ m (A y B), 2,5 mm (C y D), 2 mm (E y F).

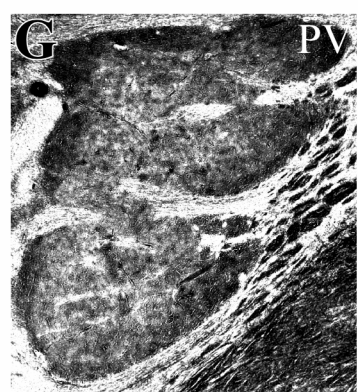
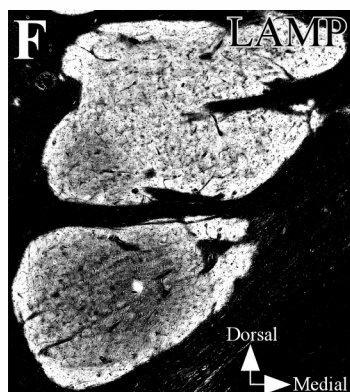
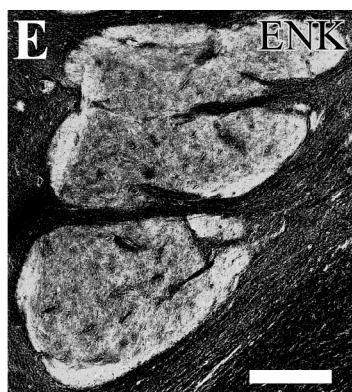
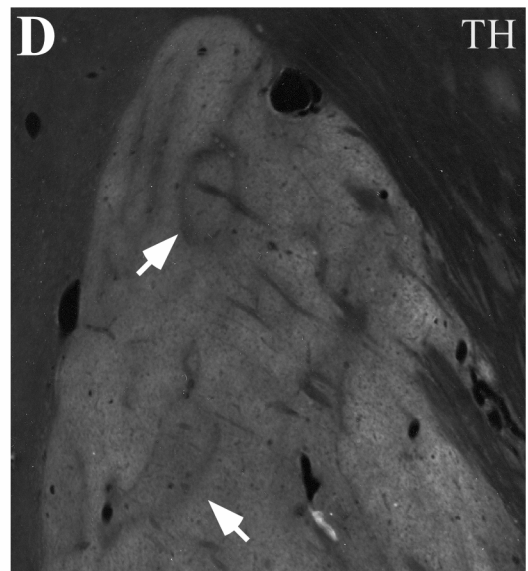
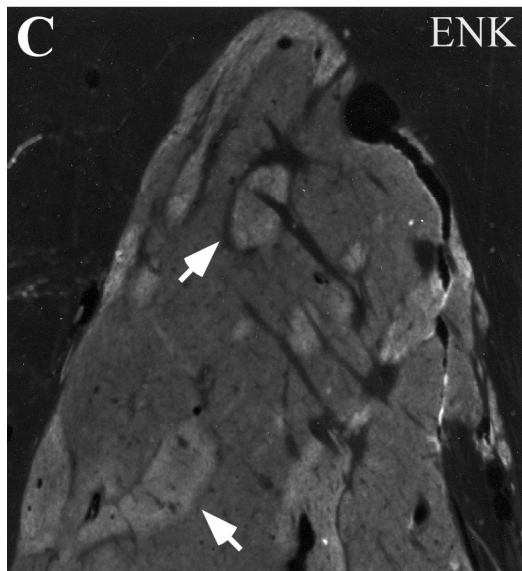
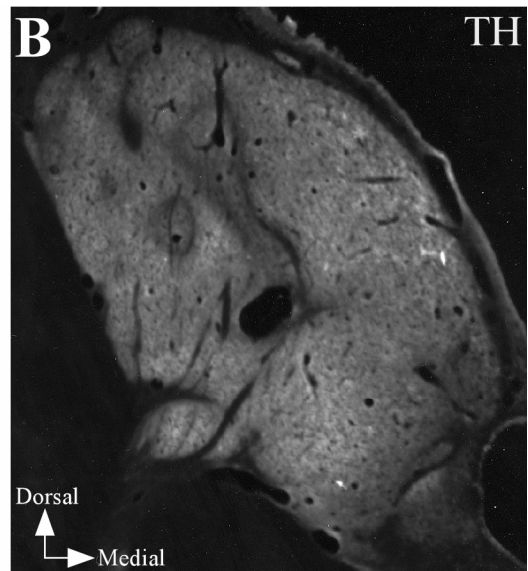
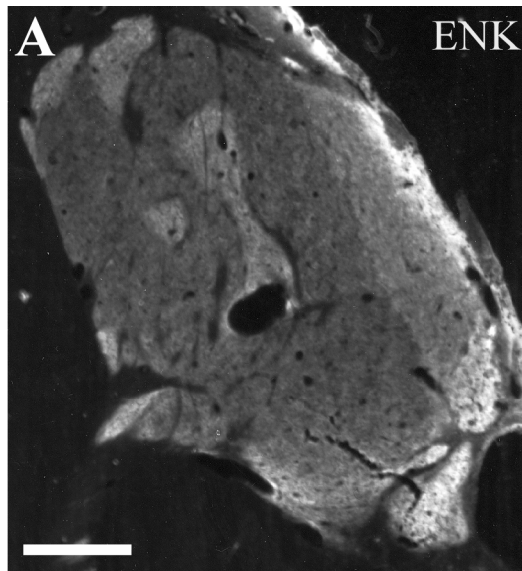






**FIGURA 8**

**Figura 8. Estriosomas revelados con marcadores dopaminérgicos en el estriado posterior y borde inmunorreactivo del putamen ventral.** Impresiones directas que ilustran la comparación del marcaje de los estriosomas revelados con ENK (**A** y **C**) y con TH (**B** y **D**). Obsérvese cómo la técnica de la TH muestra un anillo carente de esta proteína alrededor de los estriosomas, y que se asemeja a los *clear septa* revelados con ENK. En **E-G**, se muestra el borde del putamen ventral a niveles posteriores, el cual presenta un marcaje similar al del compartimento estriosomal con las técnicas de ENK (**E**), LAMP (**F**) y PV (**G**). **Abreviaciones:** *ENK*, encefalina; *LAMP*, proteína de membrana asociada al sistema límbico; *PV*, parvalbúmina; *TH*, tirosina hidroxilasa. **Barras de calibración:** 2,5 mm (A-D), 1 mm (E-F).

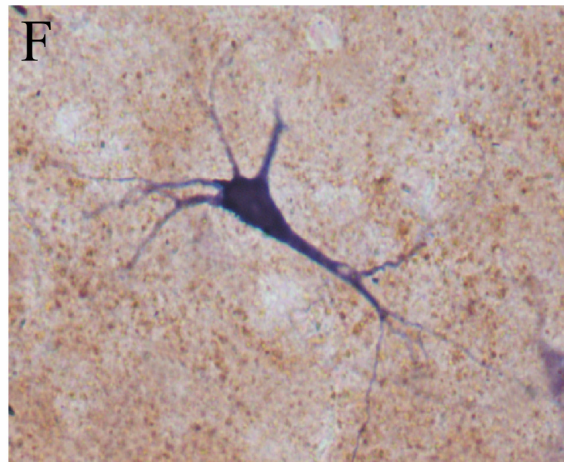
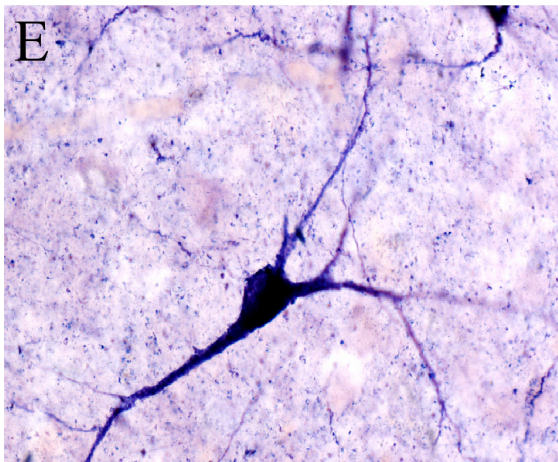
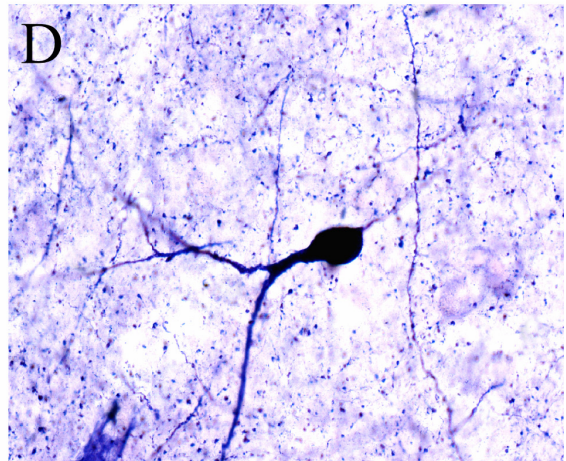
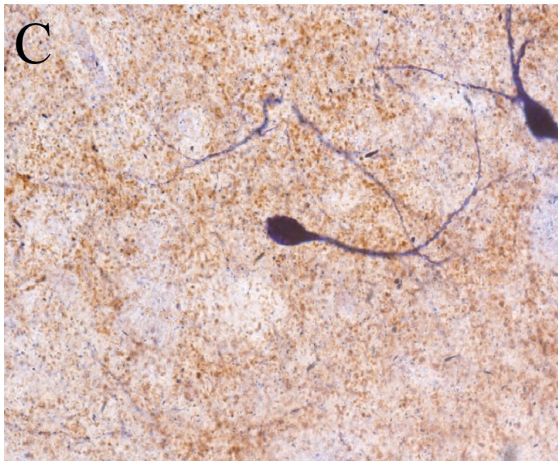
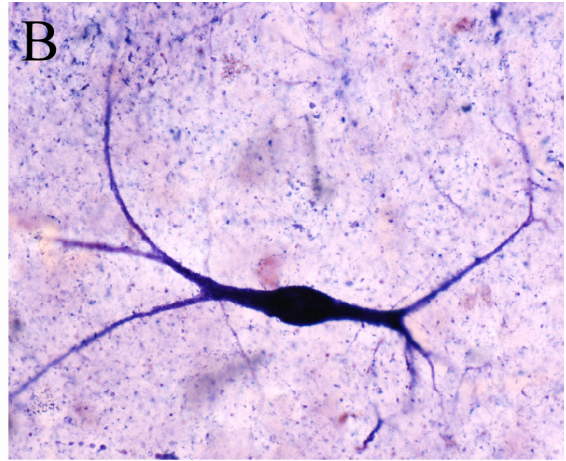
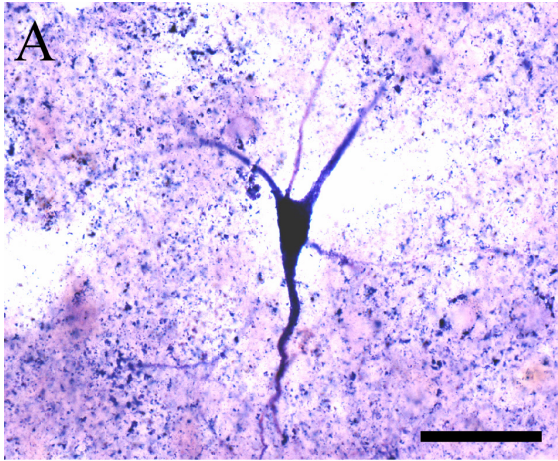




**FIGURA 9**

**Figura 9. Morfología somatodendrítica de las interneuronas nitrérgicas.** Grupo de microfotografías que ilustran los distintos grupos morfológicos en los que las interneuronas nitrérgicas del estriado fueron clasificadas: neuronas de soma triangular (**A**), de aspecto bipolar (**B**), y de soma ovoide con una (**C**), dos (**D**), tres (**E**) y cinco (**F**) dendritas primarias. Los cortes fotografiados en **A**, **B**, **D** y **E** fueron procesados para NADPH-diaforasa, mientras que los ilustrados en **C** y **F** además se trataron con la técnica inmunohistoquímica de la encefalina. **Barra de calibración:** 40  $\mu\text{m}$ .

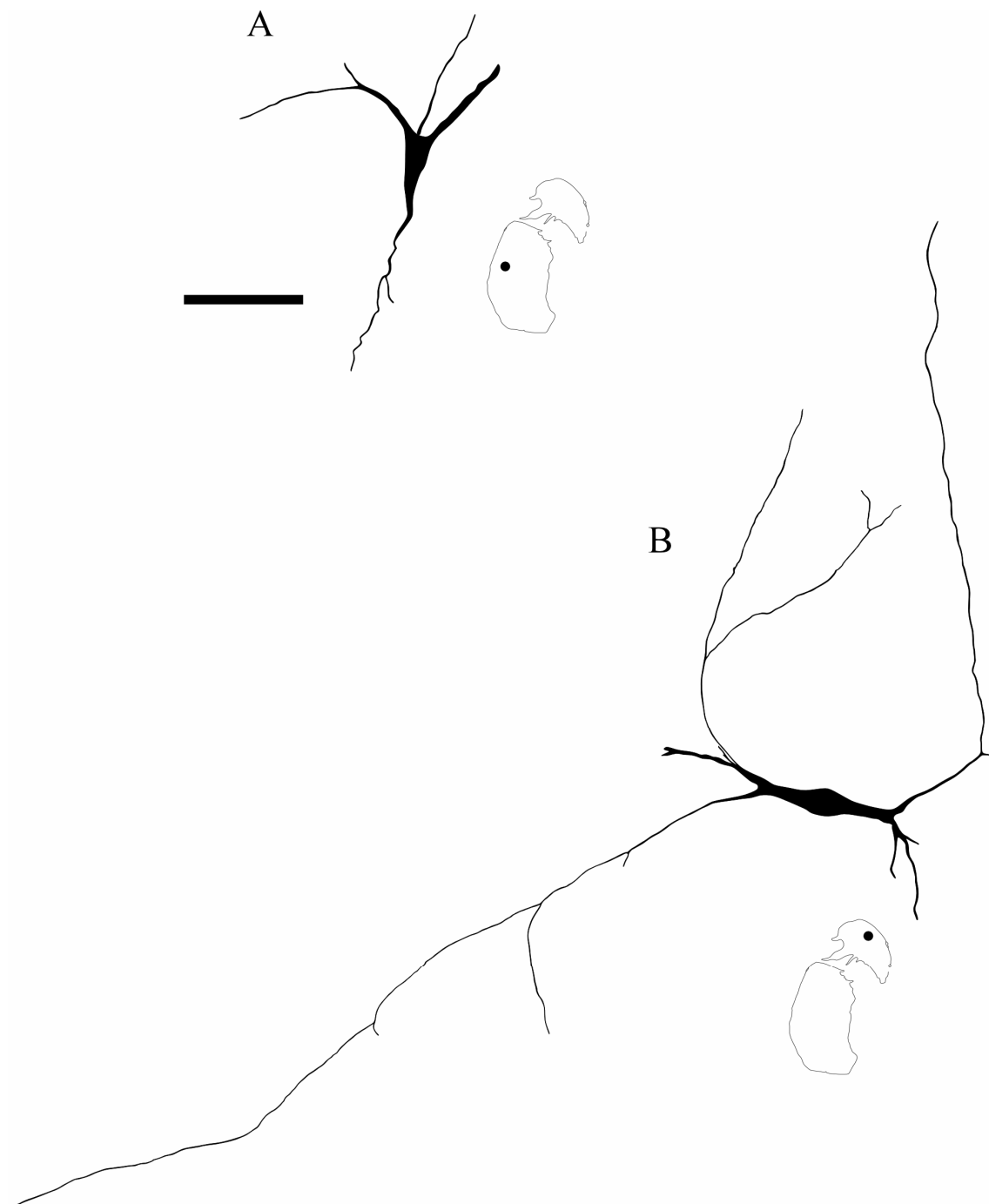






**FIGURA 10**

**Figura 10. Morfología de las interneuronas nitrérgicas triangulares y de aspecto bipolar.** Dibujos realizados con cámara clara que ilustran las características somatodendríticas de una neurona nitrérgica de soma triangular (**A**), y otra de aspecto bipolar (**B**). Éstas corresponden a las neuronas fotografiadas en A y B en la *Figura 9*, respectivamente. El punto en los esquemas que acompañan a cada dibujo muestra la localización de las neuronas en el estriado. **Barra de calibración:** 50  $\mu\text{m}$ .



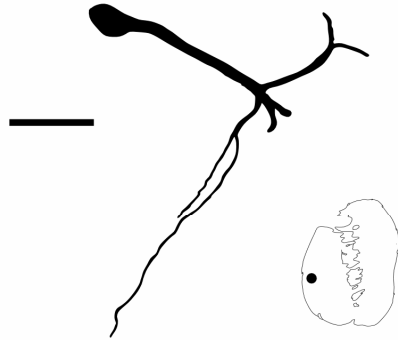


**FIGURA 11**

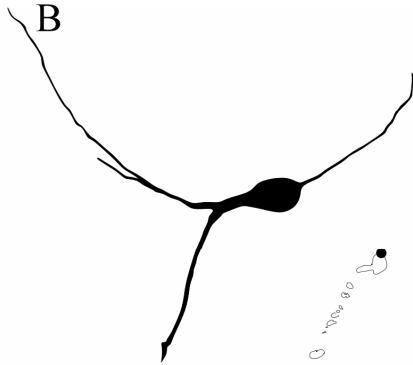
**Figura 11. Morfología de las interneuronas nitrérgicas ovoideas.** Dibujos realizados con cámara clara que ilustran las características somatodendríticas de las neuronas nitrérgicas de soma ovoide con una (**A**), dos (**B**), tres (**C**) y cinco (**D**) ramificaciones primarias. Los dibujos se corresponden con las neuronas fotografiadas en C-F en la *Figura 9*, respectivamente. El punto en los esquemas que acompañan a cada dibujo muestra la localización de las neuronas en el estriado. **Barra de calibración:** 50  $\mu\text{m}$ .



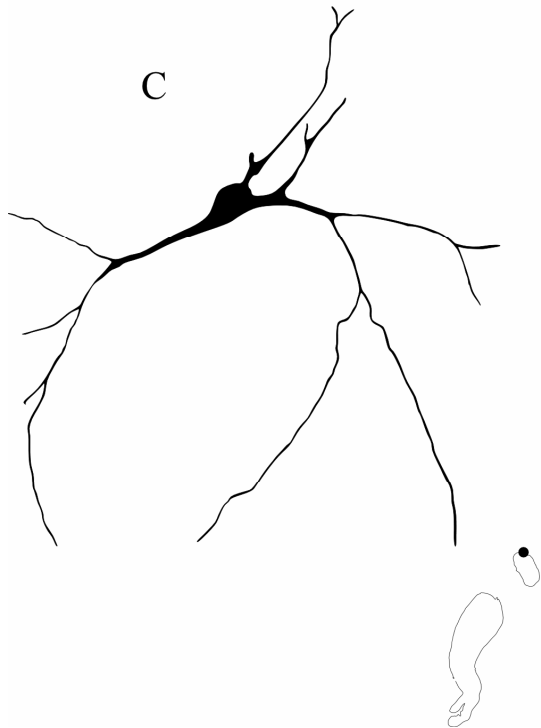
A



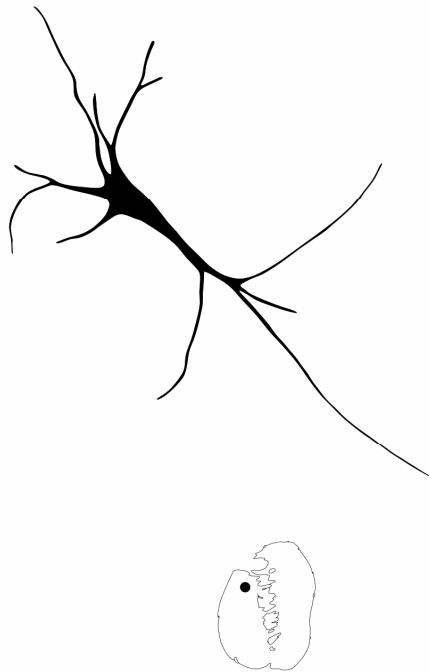
B



C



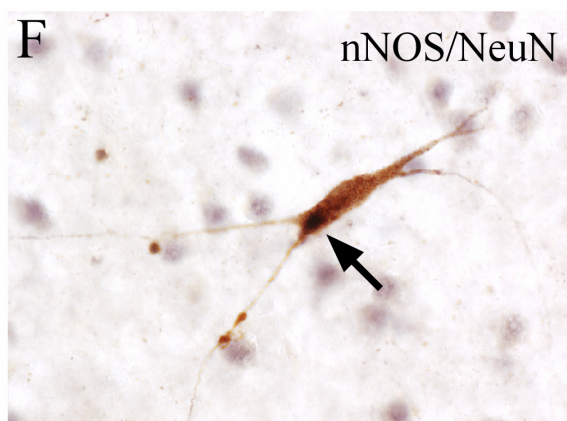
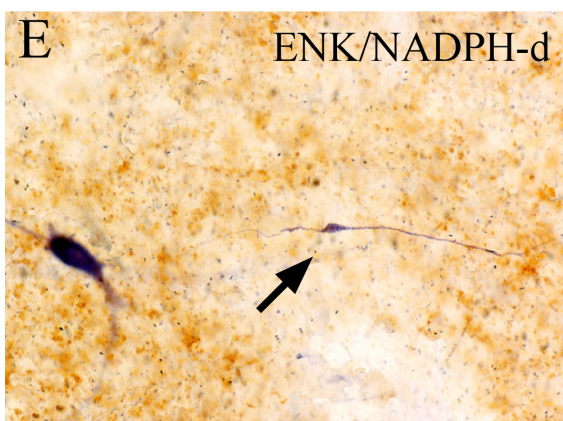
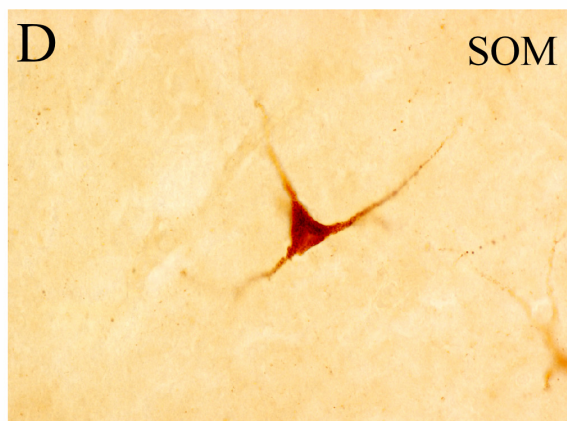
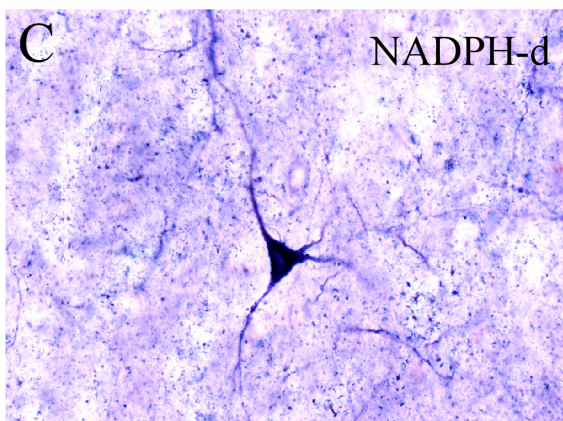
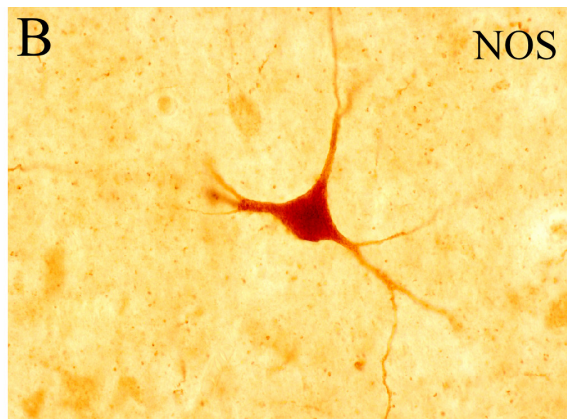
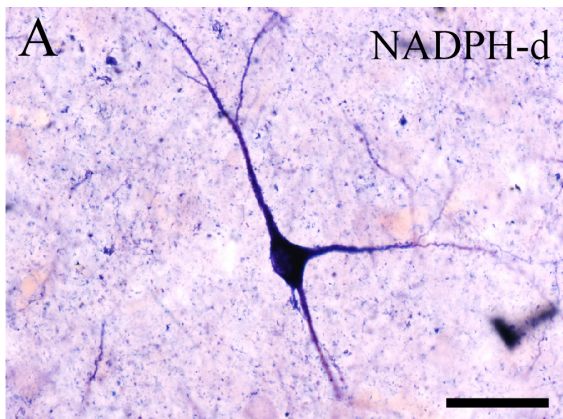
D





**FIGURA 12**

**Figura 12. Neuronas nitrérgicas reveladas con distintos marcadores.** Microfotografías que muestran algunos ejemplos de neuronas teñidas con la técnica de la NADPH-d (**A** y **C**) y su equivalencia morfológica con otras células reactivas frente a NOS (**B**) y SOM (**D**). En **E**, la flecha indica una estructura teñida con NADPH-d que inicialmente fue tomada por una neurona. En **F**, se ilustra un ejemplo de una neurona revelada frente a NOS y NeuN, y en ella se aprecia cómo estas pequeñas estructuras son varicosidades de neuronas de tamaño normal. La flecha indica dónde se encuentra el núcleo de la neurona. En ninguna de las pequeñas estructuras marcadas se encontró marcaje frente a NeuN, aunque estuvieran aparentemente separadas de las dendritas de las neuronas marcadas con NOS. **Abreviaciones:** *ENK*, encefalina; *NADPH-d*, NADPH-diaforasa; *NeuN*, proteína nuclear neuronal; *NOS*, óxido nítrico sintasa neuronal; *SOM*, somatostatina. **Barra de calibración:** 50  $\mu\text{m}$ .

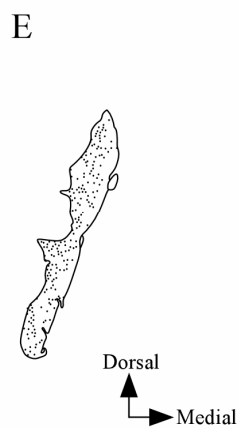
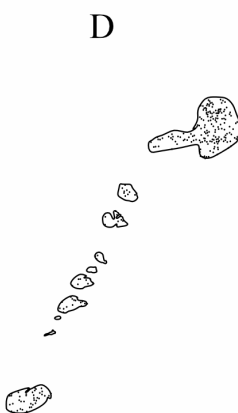
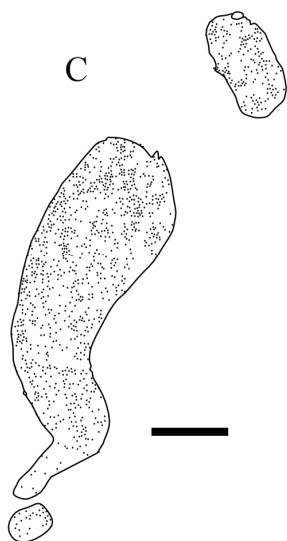
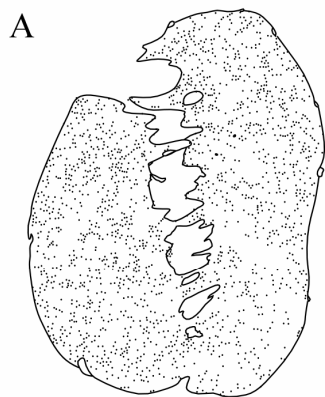
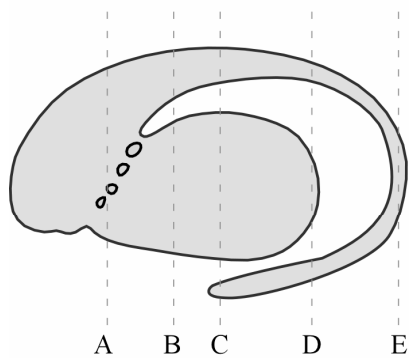




**FIGURA 13**

**Figura 13. Distribución de las interneuronas nitrérgicas en algunas secciones del estriado humano.** Dibujos realizados con cámara clara que ilustran la distribución de las interneuronas nitrérgicas en cinco cortes coronales del estriado, ordenados de anterior a posterior (A-E). Las líneas discontinuas en el esquema sagital del estriado indican los niveles a los que corresponden las secciones coronales. Cada punto representa una neurona. **Barra de calibración:** 5 mm.

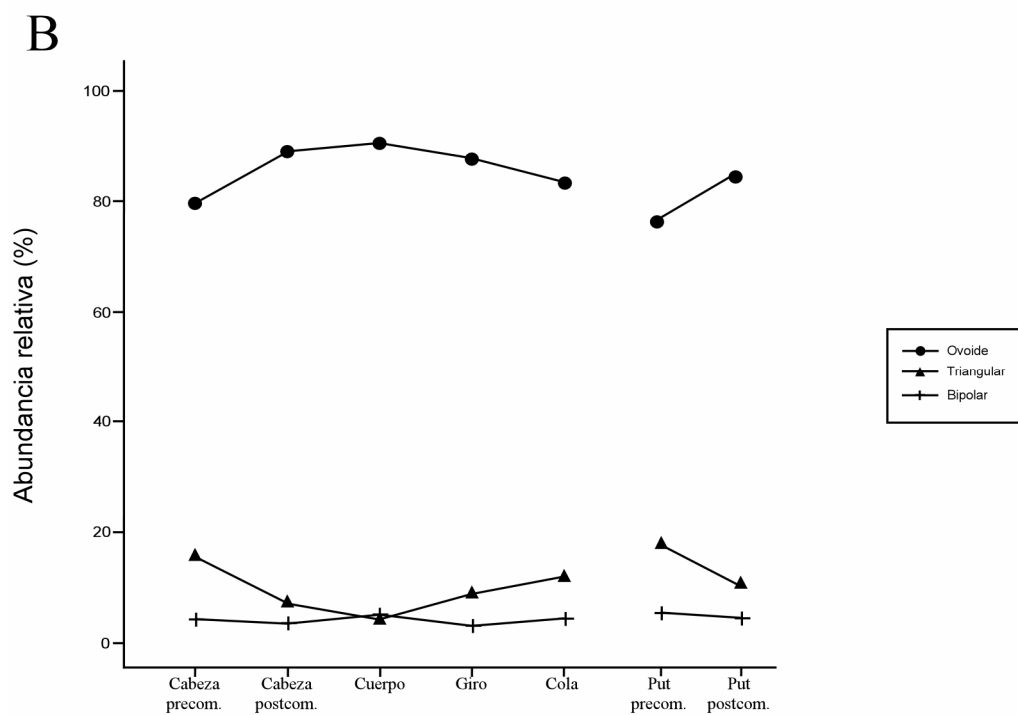
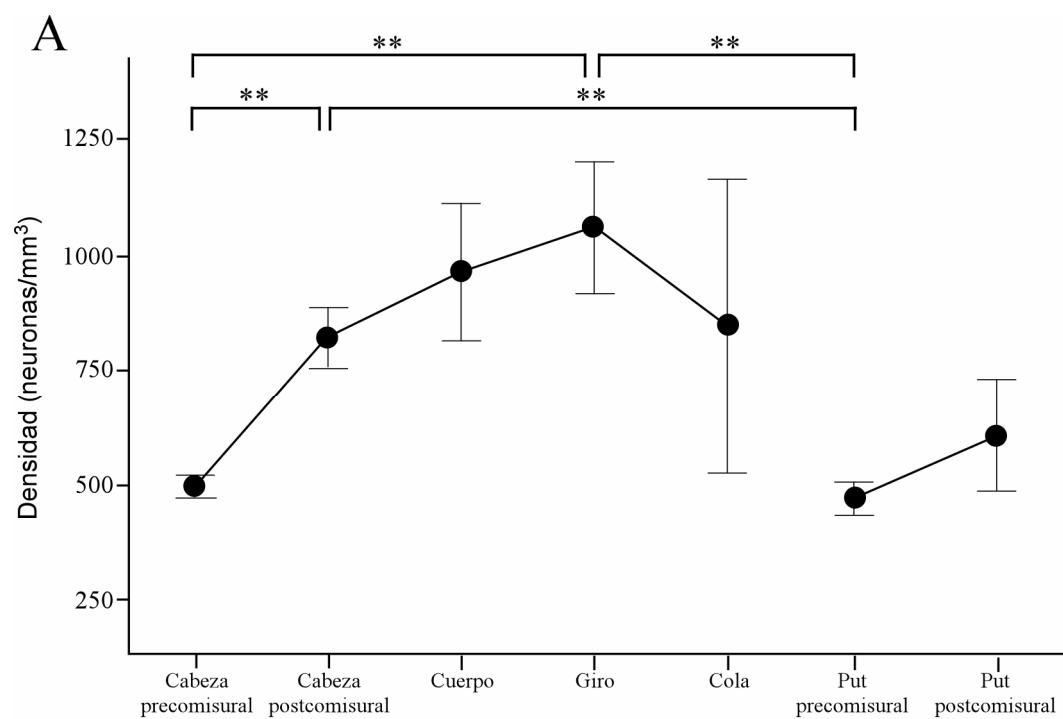






**FIGURA 14**

**Figura 14. Distribución de las neuronas nitrérgicas en el eje anteroposterior, y prevalencia de los grupos morfológicos.** Gráficos de líneas que muestran la densidad de las neuronas nitrérgicas en las distintas regiones del estriado (**A**), y la prevalencia de los distintos grupos morfológicos en las mismas (**B**). Las neuronas nitrérgicas ocupan preferentemente el núcleo caudado con respecto al Put, y son más abundantes en los territorios postcomisurales que en los precomisurales (**A**). Las neuronas de soma ovoide son más numerosas que los otros dos grupos morfológicos, mientras que las triangulares superan en número a las de aspecto bipolar en todas las regiones salvo en el cuerpo del núcleo caudado (**B**). \*\* indica diferencias estadísticas muy significativas ( $P < 0,01$ ). **Abreviaciones:** *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *Put*, putamen.

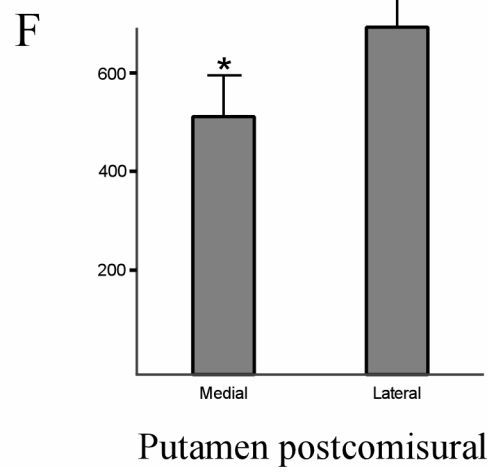
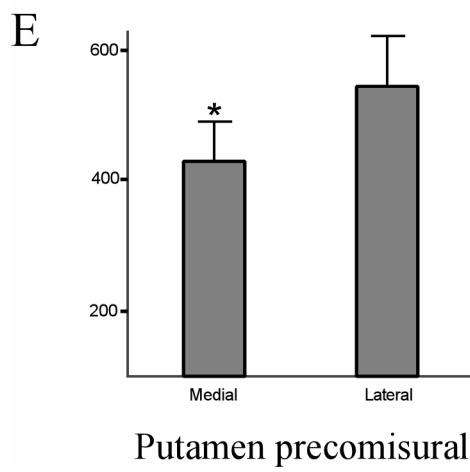
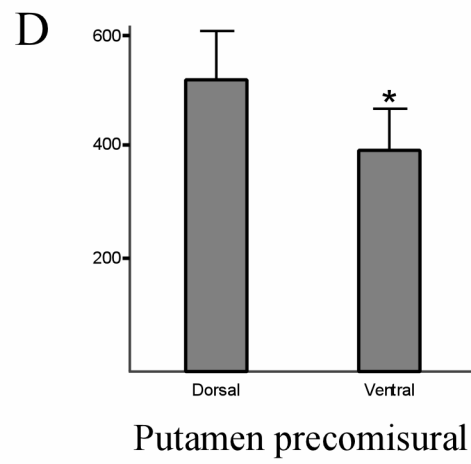
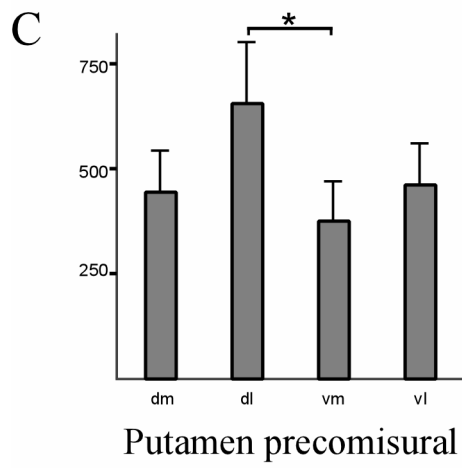
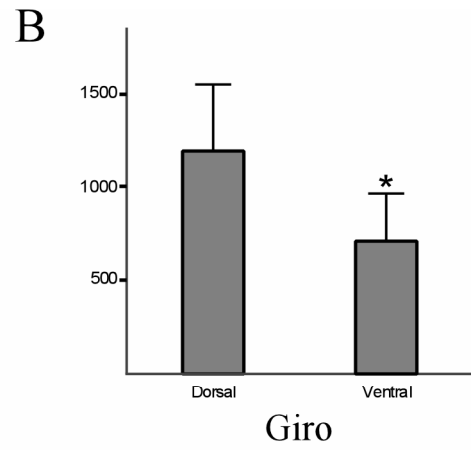
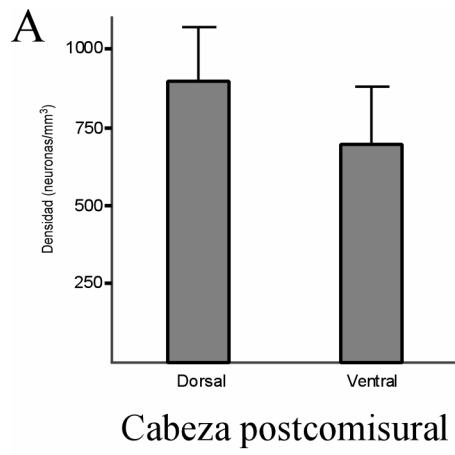




**FIGURA 15**

**Figura 15. Distribución de las interneuronas nitrérgicas en los ejes dorsoventral y mediolateral.** Gráficos de barras que comparan la densidad de las neuronas nitrérgicas en distintos sectores de la cabeza postcomisural (**A**) y el giro (**B**) del núcleo caudado, y en el putamen precomisural (**C-E**) y postcomisural (**F**). En las dos regiones del núcleo caudado (**A** y **B**) y en el putamen precomisural (**D**), la densidad es mayor en la mitad dorsal. Además, la mitad lateral de las dos regiones del putamen está más densamente poblada que la mitad medial (**E** y **F**). De hecho, el sector dl del putamen precomisural es el que mayor densidad presenta dentro de esta región (**C**). \* indica diferencias significativas ( $0,05 > P > 0,01$ ). **Abreviaciones:** *dl*, dorsolateral; *dm*, dorsomedial; *vl*, ventrolateral; *vm*, ventromedial.

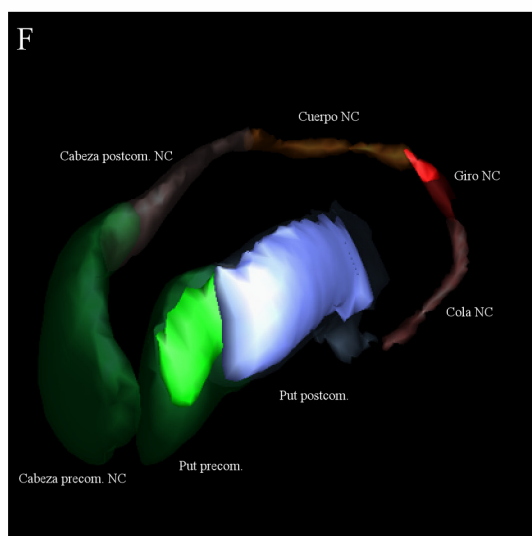
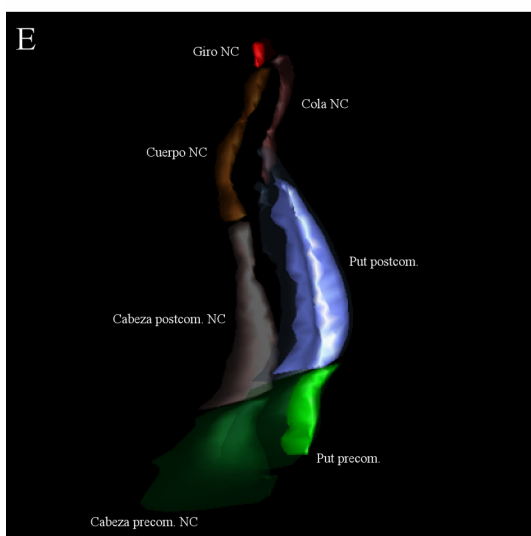
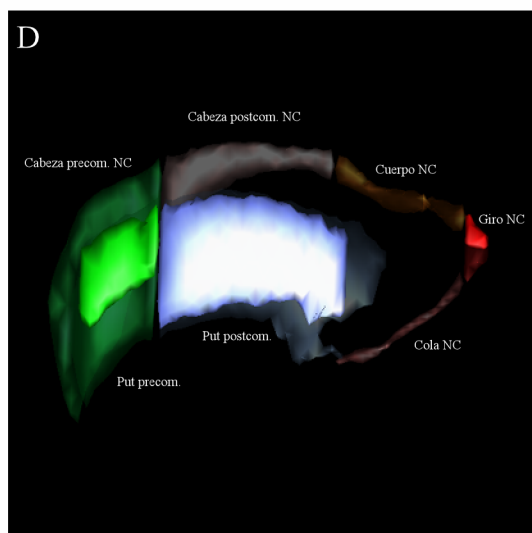
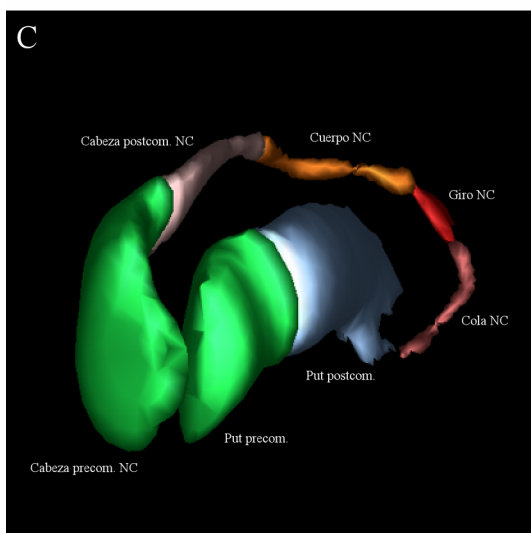
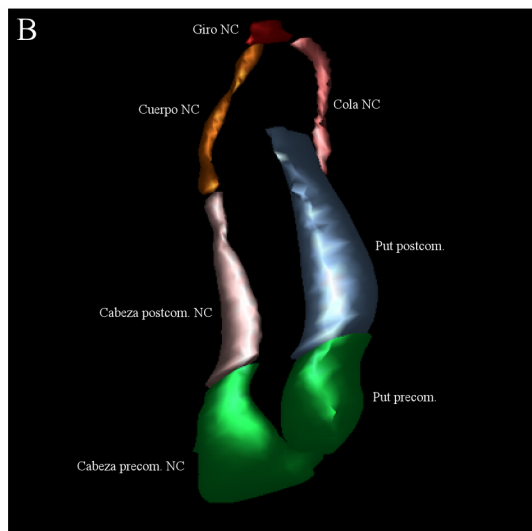
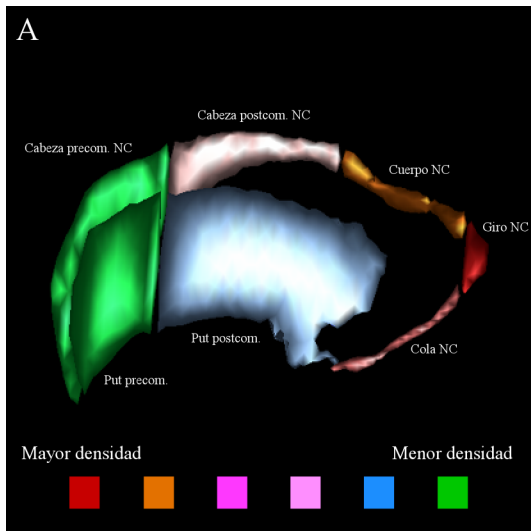






**FIGURA 16**

**Figura 16. La distribución de las interneuronas nitrérgicas es heterogénea en el estriado humano.** Esquema tridimensional que muestra la distribución selectiva de las interneuronas nitrérgicas a lo largo del eje anteroposterior del estriado (**A-C**). Además, en **D-F** se ilustra la preferencia de estas interneuronas por ocupar ciertos sectores dentro de algunas de las regiones. Como expresa el código de colores, el giro del NC es la región más densamente poblada, seguida del cuerpo, la cola y la cabeza postcomisural de dicho núcleo. La siguiente región con mayor densidad es el Put postcomisural, quedando con una menor densidad los territorios precomisurales de la cabeza del NC y del Put (**A-C**). Por otra parte, el sector dorsolateral del Put precomisural, la mitad lateral del Put postcomisural y la dorsal del giro del NC tienen una mayor densidad dentro de cada región, presentando diferencias estadísticas con respecto al resto de territorios incluidos en la zona estriatal correspondiente (**D-F**). **Abreviaciones:** NC, núcleo caudado; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *Put*, putamen.

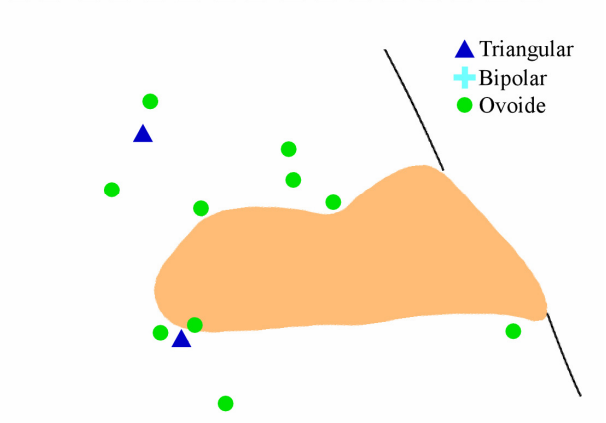
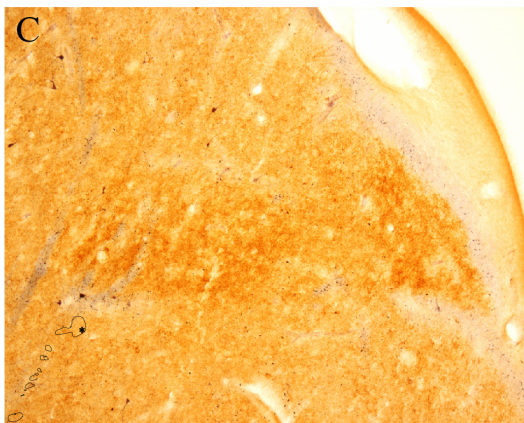
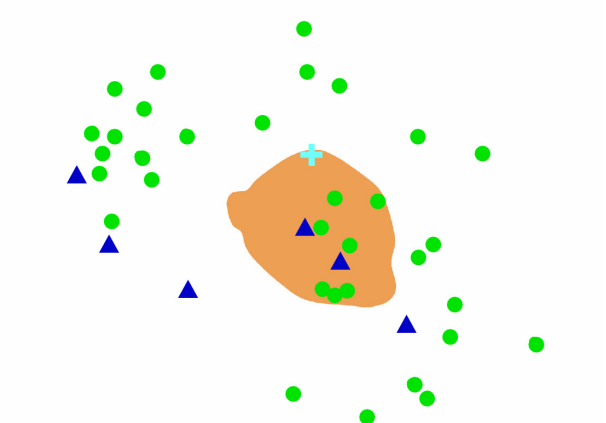
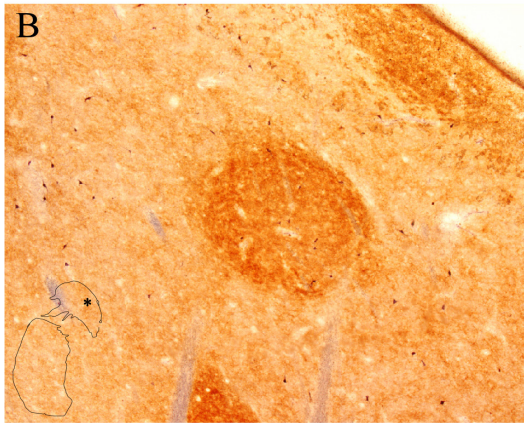
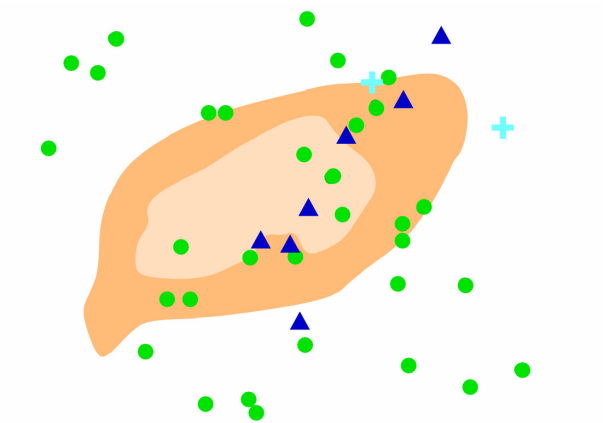
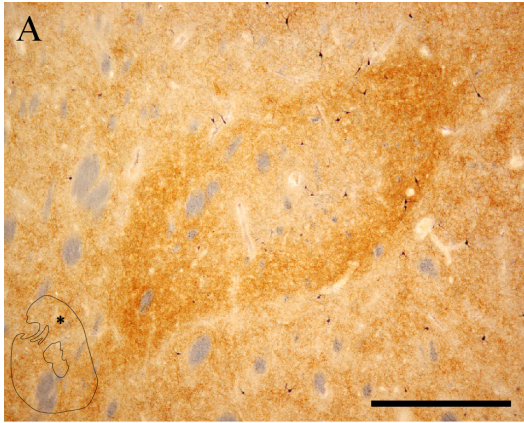




**FIGURA 17**

**Figura 17. Organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas en la cabeza y en el cuerpo del núcleo caudado.** Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de los distintos grupos morfológicos de interneuronas nitrérgicas con respecto a los estriosomas, revelados con encefalina, en la cabeza precomisural (**A**) y postcomisural (**B**), y en el cuerpo (**C**) del núcleo caudado. El asterisco dentro del dibujo esquemático incluido en cada microfotografía indica la posición del estriosoma. En **A** se observa cómo las interneuronas son abundantes en el centro y en la periferia estriosomal, y también aparecen en los límites entre los distintos compartimentos. En **B**, las neuronas pueblan de un modo similar el interior del estriosoma, aunque su presencia en la matriz circundante al “parche” es menor. En **C**, las neuronas desaparecen del interior del estriosoma y tienden a situarse en el límite entre él y la matriz. **Barra de calibración:** 200  $\mu\text{m}$  (A y B), 100  $\mu\text{m}$  (C).

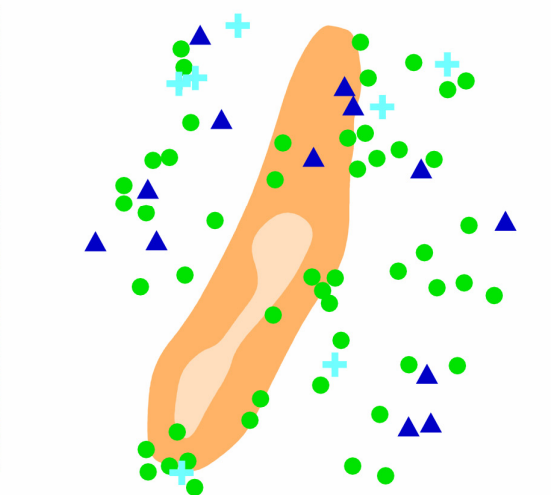
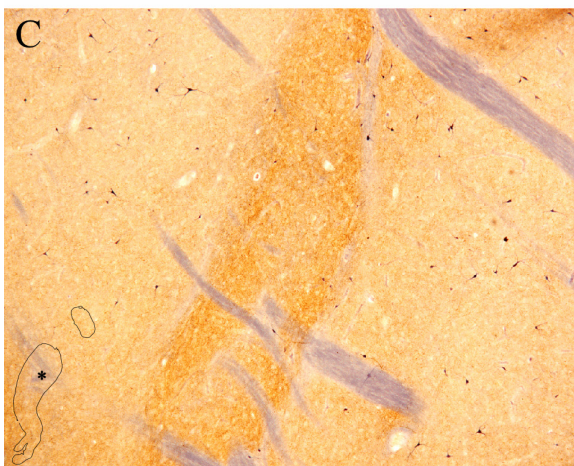
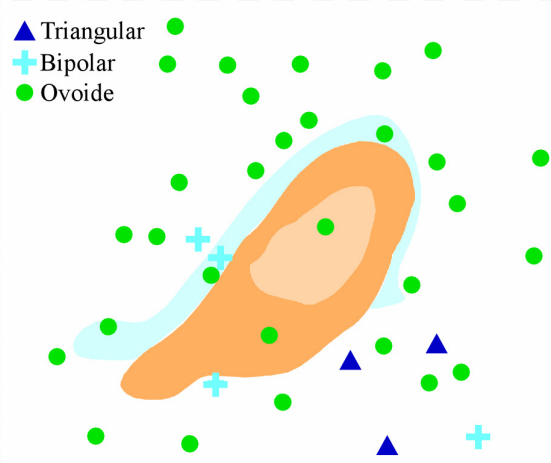
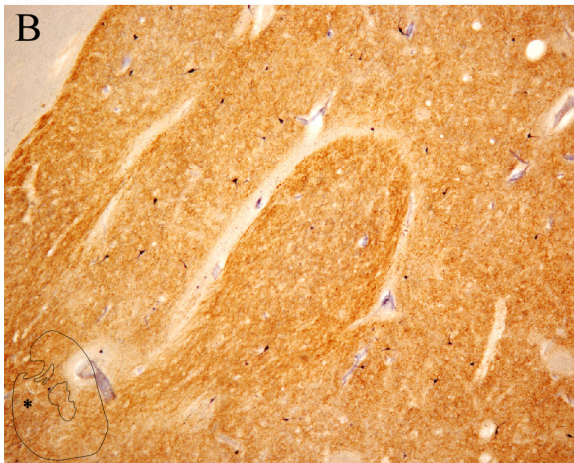
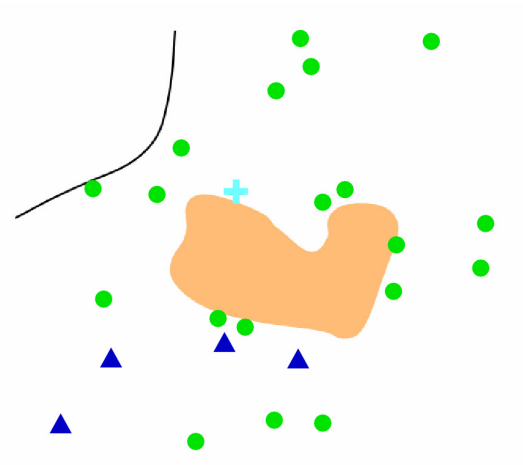
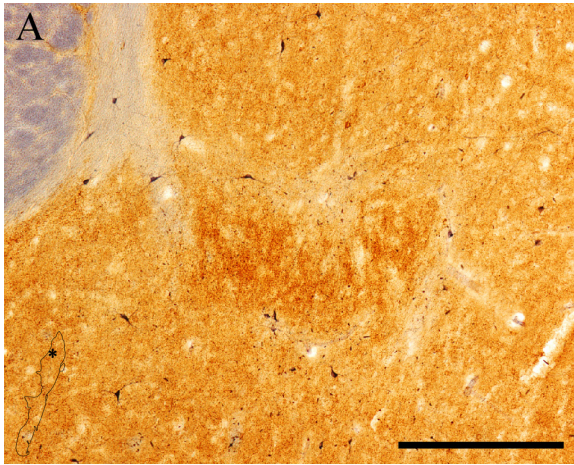






**FIGURA 18**

**Figura 18. Organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas en el giro del núcleo caudado y en el putamen.** Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de los distintos grupos morfológicos de interneuronas nitrérgicas con respecto a los estriosomas, revelados con encefalina, en el giro del núcleo caudado (**A**), y en el putamen precomisural (**B**) y postcomisural (**C**). El asterisco dentro del dibujo esquemático incluido en cada microfotografía indica la posición del estriosoma. En **A**, se observa cómo las interneuronas no aparecen dentro del estriosoma, pero son abundantes en sus bordes. En **B**, las neuronas pueblan el centro y la periferia estriosomal, y están también en el borde entre la matriz y el estriosoma, aunque en bajo número. En **C**, las neuronas son abundantes en la periferia del estriosoma, pero no pueblan el centro. Además, aparecen en los límites entre los distintos compartimentos. **Barra de calibración:** 100  $\mu\text{m}$  (**A**), 200  $\mu\text{m}$  (**B** y **C**).

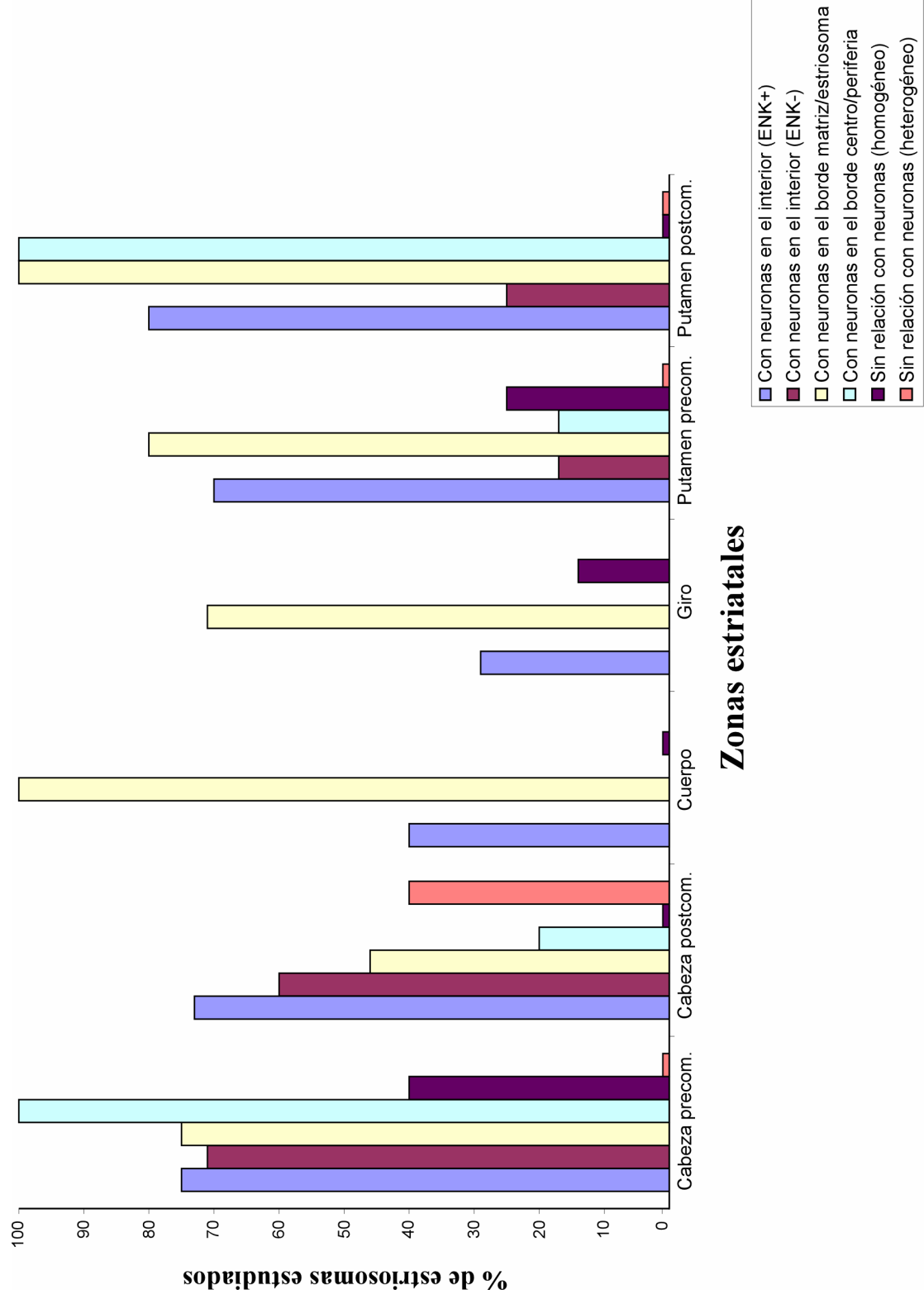




**FIGURA 19**

**Figura 19. Análisis cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas.** Gráfico de barras que indica, para las distintas regiones del estriado, el porcentaje de estriosomas que cumplieron cada una de las condiciones citadas en la leyenda. La cabeza precomisural del núcleo caudado y el putamen postcomisural son las regiones que presentan un mayor porcentaje de estriosomas en relación con las interneuronas, especialmente en los bordes entre los distintos compartimentos. Por otra parte, el cuerpo y el giro del núcleo caudado tienen pocos estriosomas con neuronas dentro, y la mayoría de ellos contienen somas en sus bordes. En la cabeza postcomisural y en el putamen precomisural destaca el bajo porcentaje de estriosomas con neuronas en el borde entre el centro y la periferia. **Abreviaciones:** *ENK*, encefalina; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural.

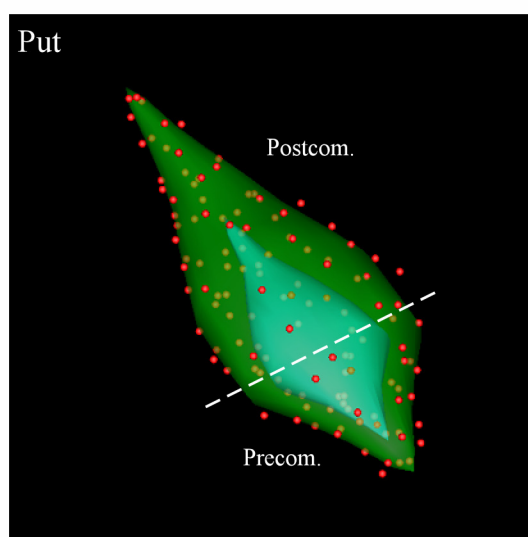
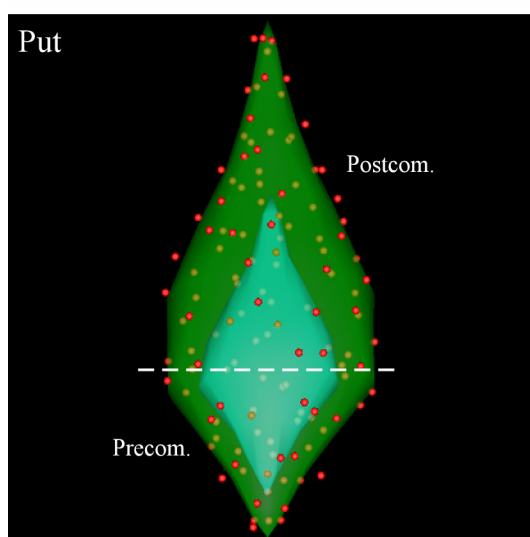
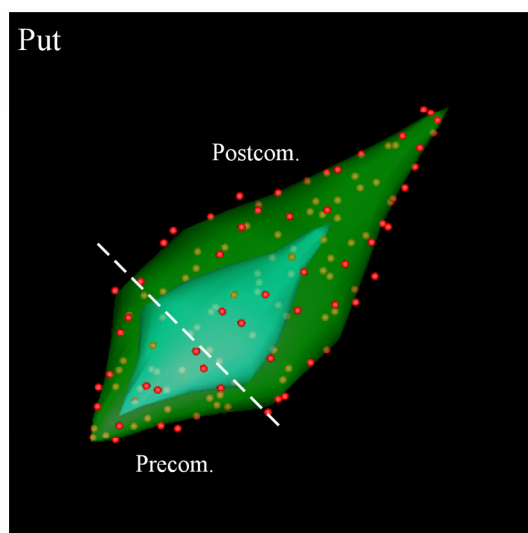
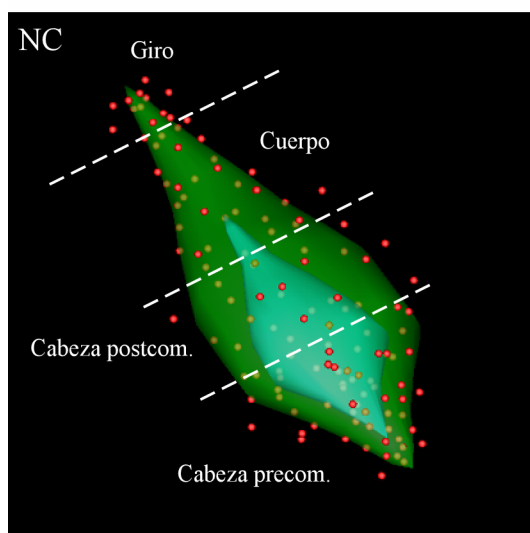
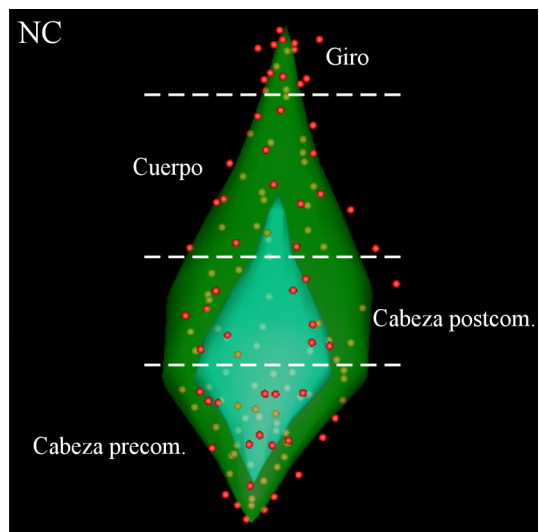
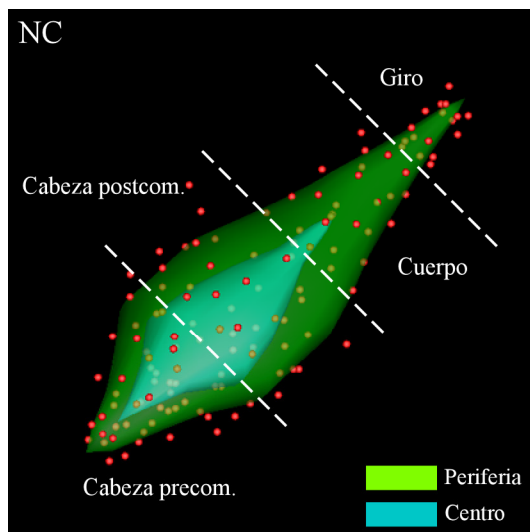






**FIGURA 20**

**Figura 20. La organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas es heterogénea a lo largo del eje anteroposterior del estriado.** Esquemas tridimensionales que ilustran la organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas. Las tres primeras imágenes muestran diferentes vistas de un estriosoma esquemático situado en las distintas regiones del NC, mientras que las tres últimas se aplican a un estriosoma localizado en el Put. En la cabeza precomisural del NC, las interneuronas ocupan el centro y la periferia estriosomal, y los límites entre ambos. La situación en la cabeza postcomisural del NC es similar, aunque el número de neuronas en el centro es menor. A niveles posteriores, las interneuronas tienden a abandonar el interior del estriosoma y a situarse en los bordes entre la matriz y el compartimento estriosomal. En el Put, la organización es bastante homogénea, apareciendo una mayor cantidad de neuronas en relación con el estriosoma en la región postcomisural. **Abreviaciones:** NC, núcleo caudado; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *Put*, putamen.

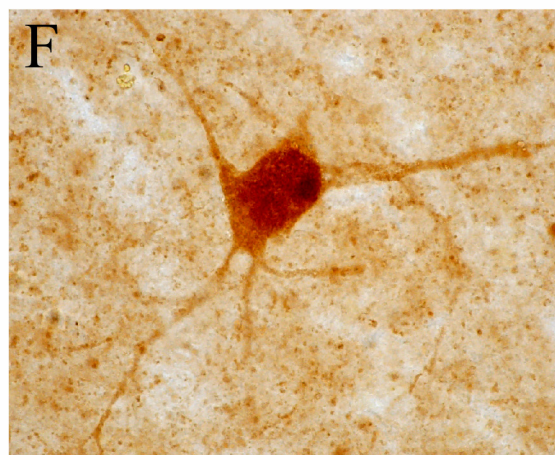
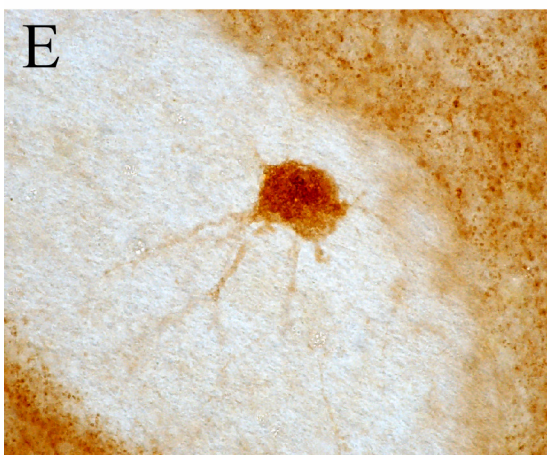
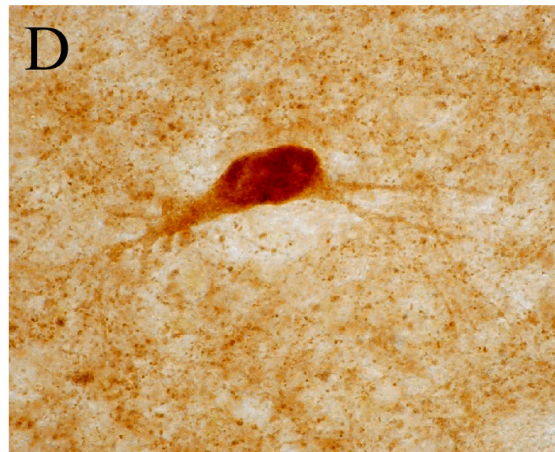
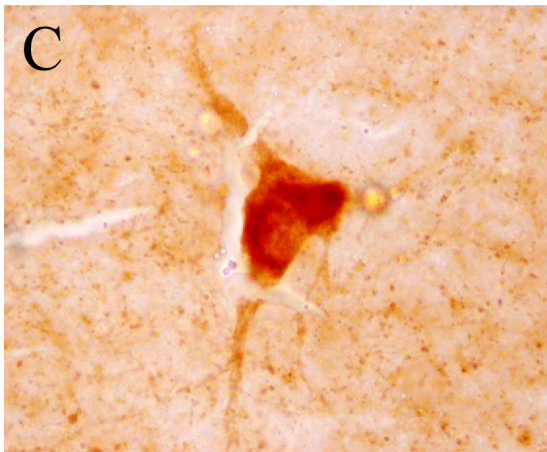
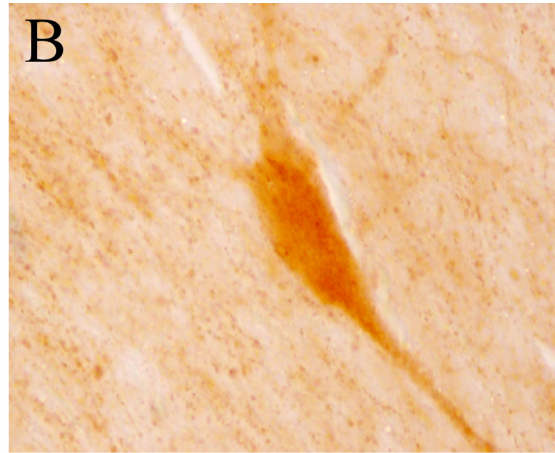
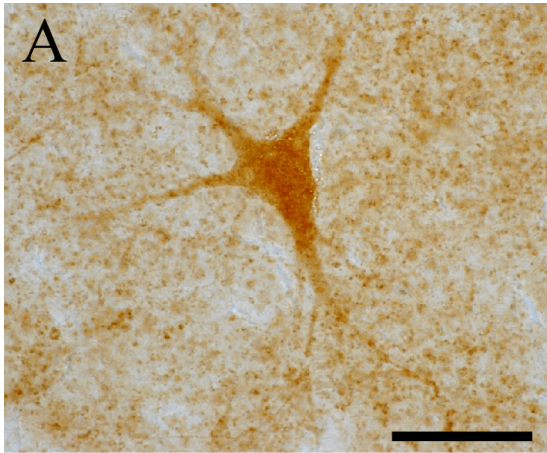




**FIGURA 21**

**Figura 21. Diversidad morfológica de las interneuronas colinérgicas.** Grupo de microfotografías que ilustran la diversidad morfológica de las interneuronas colinérgicas del estriado, reveladas con la técnica inmunohistoquímica de la colina acetiltransferasa. En **A**, se observa una neurona de soma poligonal con cuatro ramificaciones primarias; en **B** y **D**, se muestran dos neuronas de soma alargado o fusiforme con tres (**B**) y dos (**D**) dendritas primarias; en **C**, aparece una neurona de soma triangular con tres prolongaciones primarias, mientras que en **E** y **F** se ilustran dos neuronas de soma ovoide o globular con un gran número de finas dendritas (**E**) o con cuatro ramificaciones primarias (**F**). **Barra de calibración:** 40  $\mu\text{m}$ .







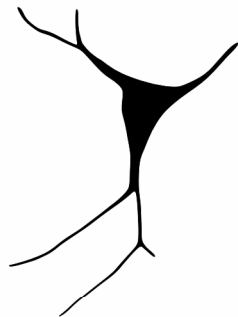
**FIGURA 22**

**Figura 22. Morfología somatodendrítica de las interneuronas colinérgicas.** Dibujos realizados con cámara clara que ilustran las características somatodendríticas de algunas interneuronas estriatales colinérgicas. **A** y **B**, corresponden a las neuronas fotografiadas en B y C en la *Figura 21*, respectivamente, mientras que **C** y **D** corresponden a aquéllas ilustradas en D y F de la citada figura. El punto en los esquemas que acompañan a cada dibujo muestra la localización de las neuronas en el estriado. **Barra de calibración:** 50  $\mu\text{m}$ .

A



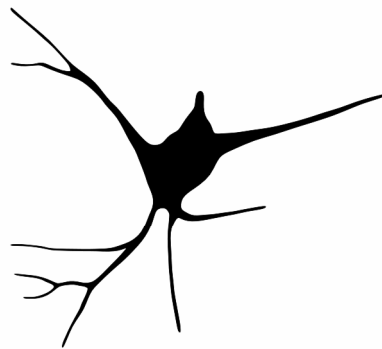
B



C



D

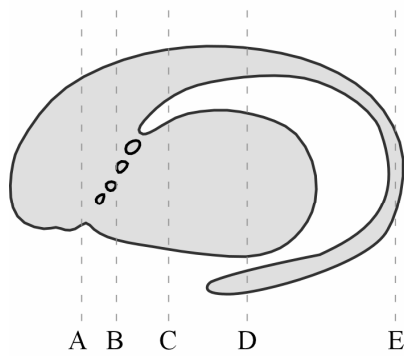




**FIGURA 23**

**Figura 23. Distribución de las interneuronas colinérgicas en algunas secciones del estriado humano.** Dibujos realizados con el sistema Neurolucida que ilustran la distribución de las interneuronas colinérgicas en cinco cortes coronales del estriado, ordenados de anterior a posterior (A-E). Las líneas discontinuas en el esquema sagital del estriado indican los niveles a los que corresponden las secciones coronales. Cada punto representa una neurona. **Barra de calibración:** 5 mm.

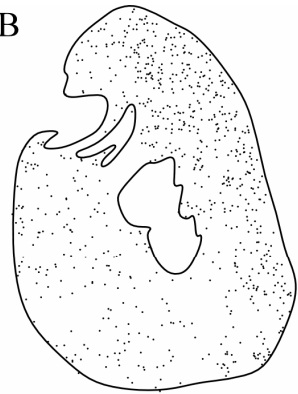




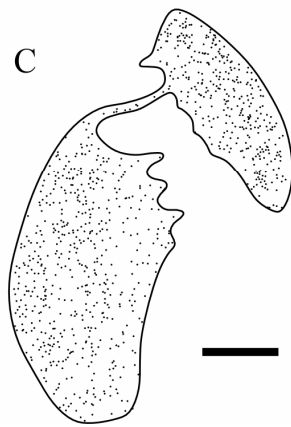
A



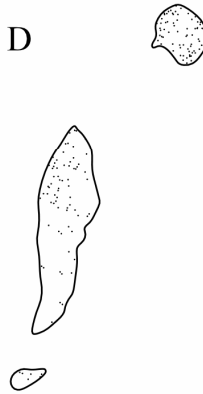
B



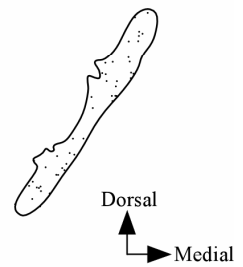
C



D



E

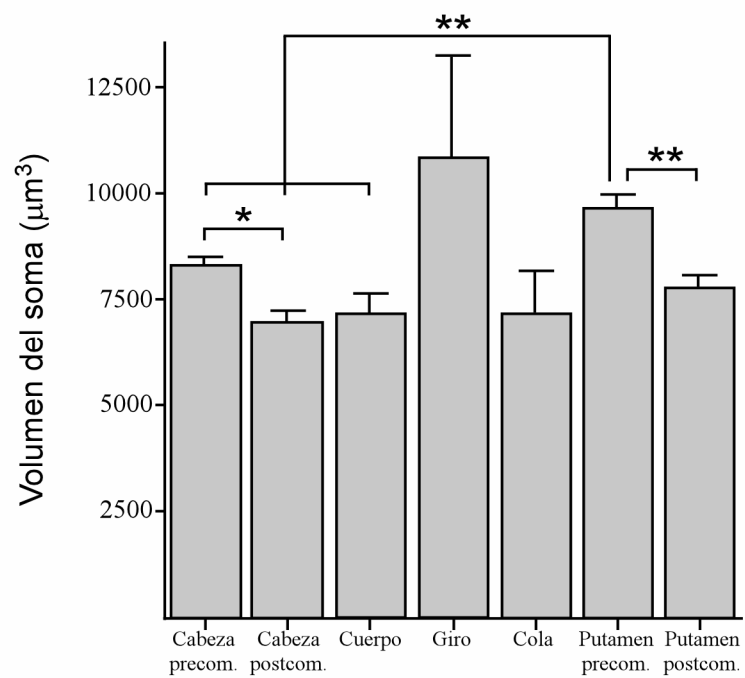




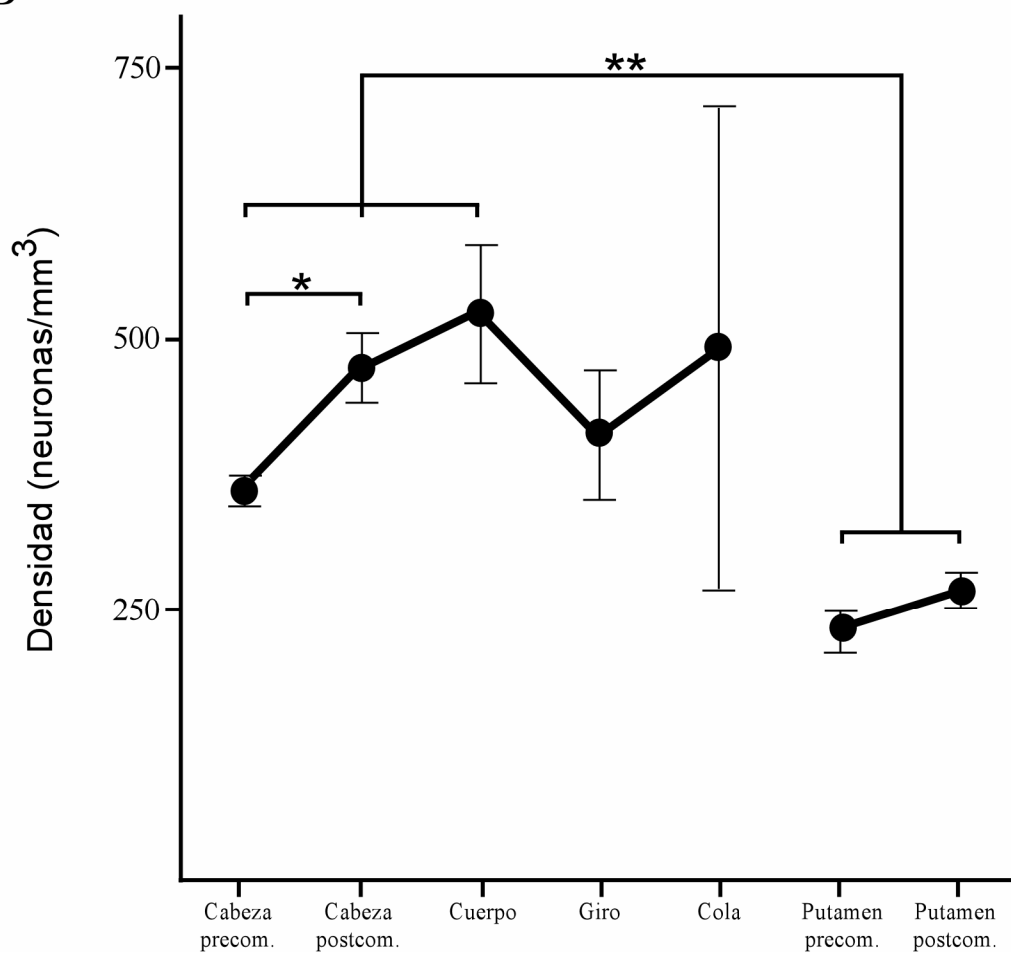
**FIGURA 24**

**Figura 24. Volumen del soma y distribución de las interneuronas colinérgicas en el eje anteroposterior del estriado.** En **A**, se muestra un gráfico de barras que pone de manifiesto el diferente volumen del soma de las interneuronas colinérgicas en algunas regiones del estriado humano. El giro del núcleo caudado fue la región con neuronas de mayor tamaño seguida del putamen precomisural, que presentó diferencias estadísticamente muy significativas con la cabeza precomisural y postcomisural y el cuerpo del núcleo caudado, y con el putamen postcomisural. Además, aparecieron diferencias estadísticamente significativas al comparar el volumen del soma de las neuronas de la cabeza precomisural del núcleo caudado con los valores de la cabeza postcomisural (**A**). En **B**, se presenta un gráfico de líneas que muestra la densidad de las neuronas colinérgicas en las distintas regiones del estriado. Estas interneuronas ocupan preferentemente el núcleo caudado con respecto al putamen, y son más abundantes en los territorios postcomisurales que en los precomisurales (**B**). Sin embargo, en el giro del núcleo caudado se produce un descenso en la densidad neuronal, alcanzando valores similares a los de la cabeza precomisural. En ambos gráficos, \* indica diferencias estadísticamente significativas ( $0,05 > P > 0,01$ ), y \*\* diferencias muy significativas ( $P < 0,01$ ). **Abreviaciones:** *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural.

A



B

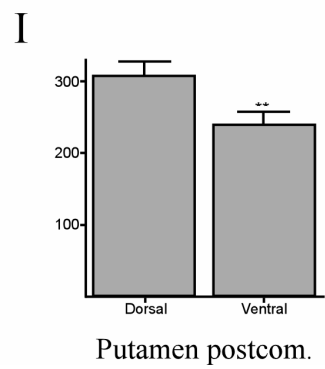
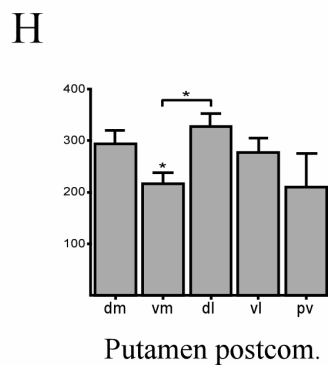
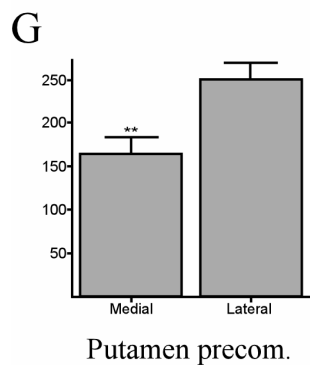
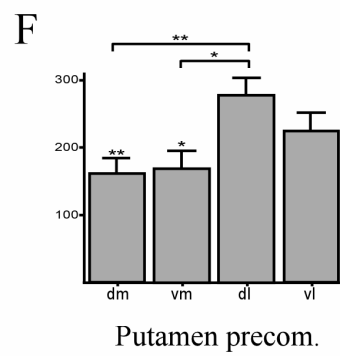
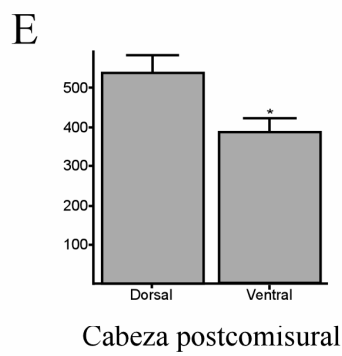
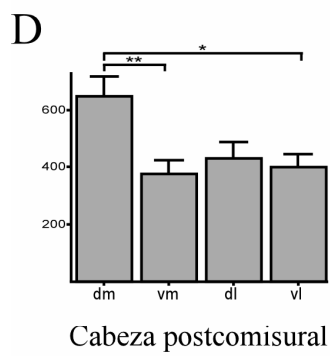
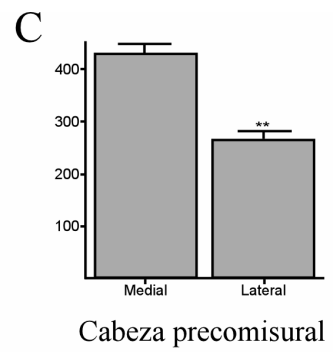
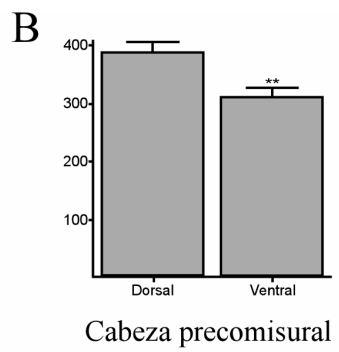
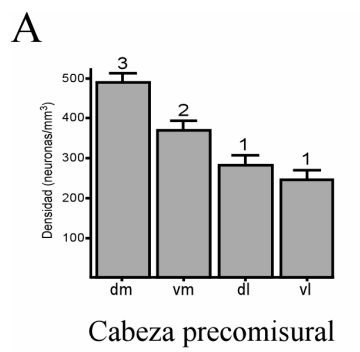




**FIGURA 25**

**Figura 25. Distribución de las interneuronas colinérgicas en los ejes dorsoventral y mediolateral.** Gráficos de barras que comparan la densidad de las neuronas colinérgicas en distintos sectores de la cabeza precomisural (**A-C**) y postcomisural (**D** y **E**) del núcleo caudado, y en el putamen precomisural (**F** y **G**) y postcomisural (**H** e **I**). En las dos regiones del núcleo caudado, la densidad es mayor en el sector *dm* (**A** y **D**), en la mitad dorsal (**B** y **E**) y en la medial (**C**). En las dos regiones del putamen, el sector *dl* está especialmente poblado por estas interneuronas (**F** y **H**), así como la mitad lateral del putamen precomisural (**G**), y la mitad dorsal del putamen postcomisural (**I**). \* indica diferencias estadísticamente significativas ( $0,05 > P > 0,01$ ), y \*\* muy significativas ( $P < 0,01$ ); los números sobre las barras en **A**, indican los grupos obtenidos en la prueba estadística a posteriori *Tukey B*. **Abreviaciones:** *dl*, dorsolateral; *dm*, dorsomedial; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *pv*, posteroventral; *vl*, ventrolateral; *vm*, ventromedial.

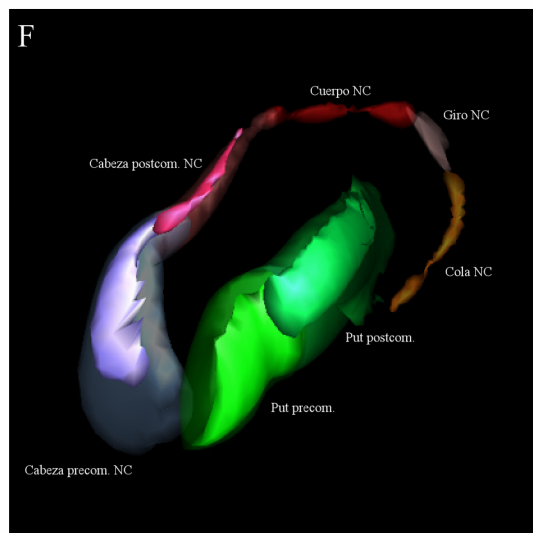
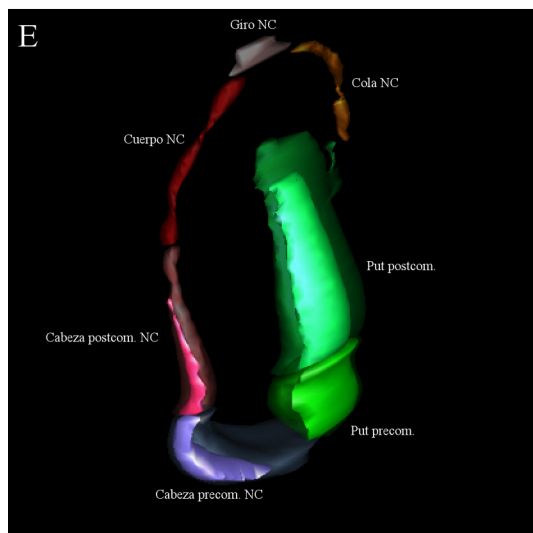
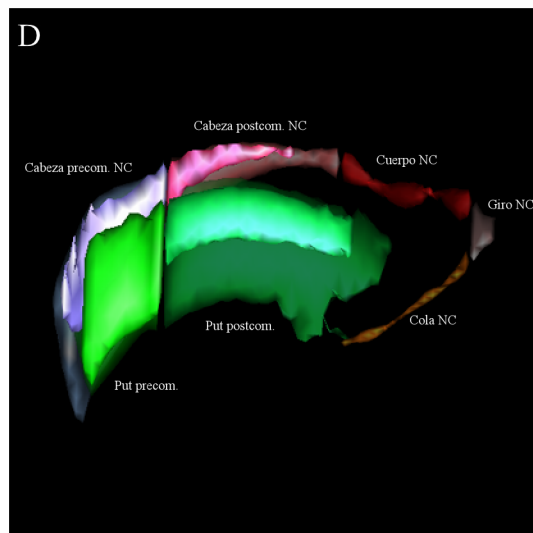
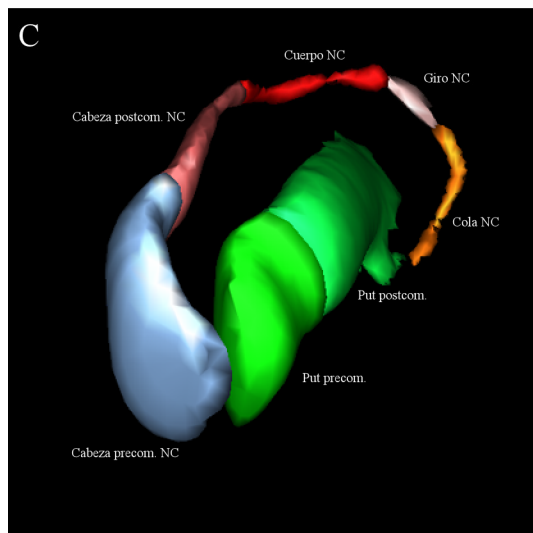
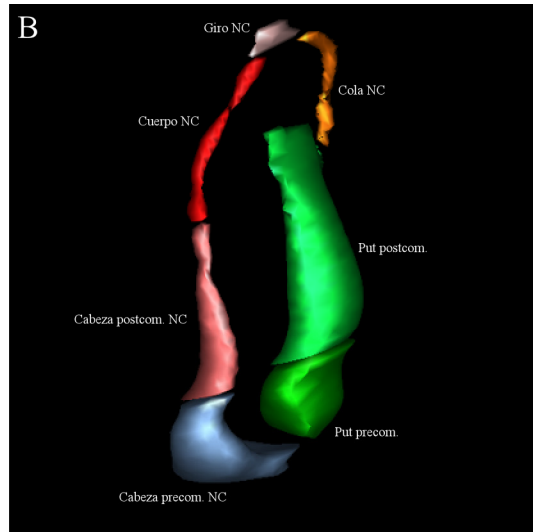
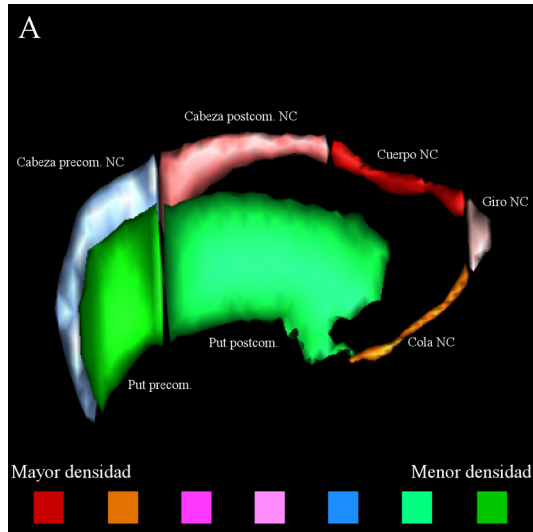






**FIGURA 26**

**Figura 26. La distribución de las interneuronas colinérgicas es heterogénea en el estriado humano.** Esquema tridimensional que muestra la distribución selectiva de las interneuronas colinérgicas a lo largo del eje anteroposterior del estriado (**A-C**). Además, en **D-F** se ilustra la preferencia de estas interneuronas por ocupar ciertos sectores dentro de algunas de las regiones. Como expresa el código de colores, el cuerpo del NC es la región más densamente poblada, seguido de la cola, la cabeza postcomisural, el giro, y la cabeza precomisural de dicho núcleo. Las regiones menos pobladas por estas neuronas son el Put postcomisural y el precomisural (**A-C**). Por otra parte, el sector dorsomedial de la cabeza precomisural y postcomisural del NC, la mitad lateral del Put precomisural, y el sector dorsolateral del Put postcomisural tienen una mayor densidad dentro de cada región, presentando diferencias estadísticas con respecto al resto de territorios incluidos en la zona estriatal correspondiente. **Abreviaciones:** NC, núcleo caudado; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *Put*, putamen.

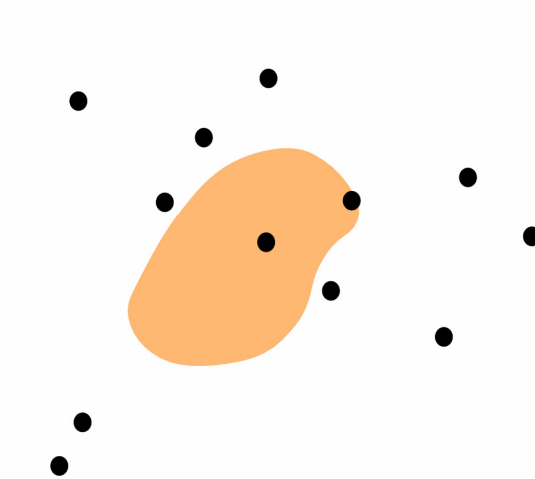
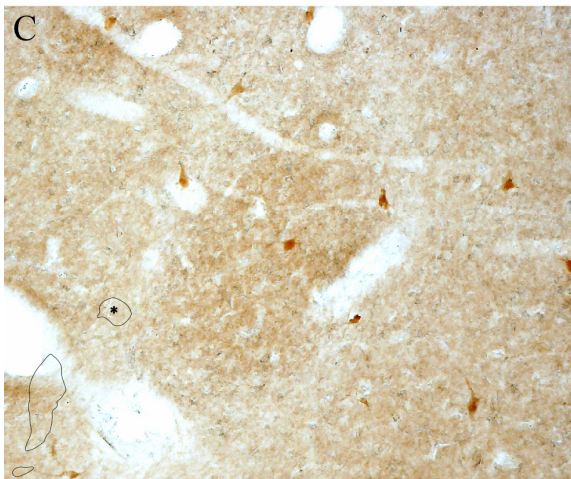
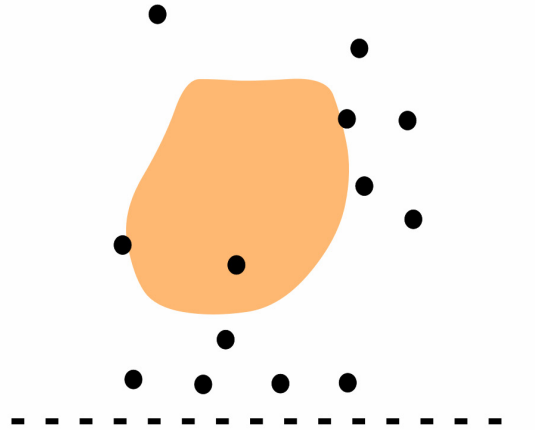
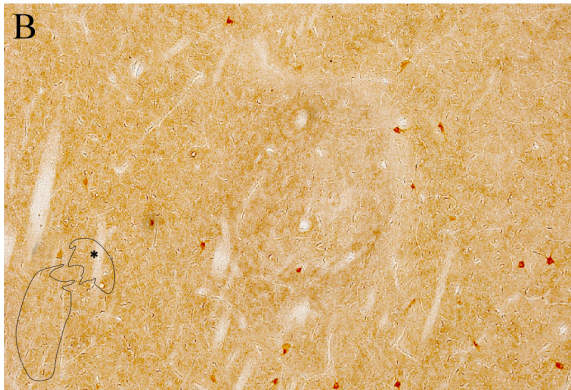
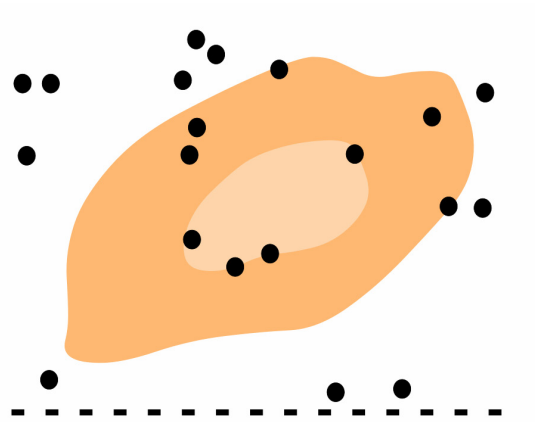
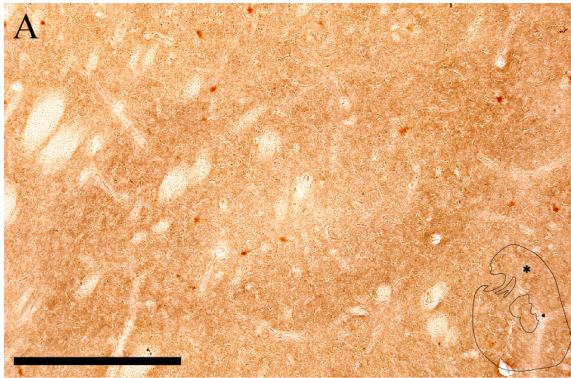




**FIGURA 27**

**Figura 27. Organización compartimental de las interneuronas colinérgicas en la cabeza y en el cuerpo del núcleo caudado.** Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de las interneuronas colinérgicas con respecto a los estriosomas, revelados con encefalina, en la cabeza precomisural (**A**) y postcomisural (**B**), y en el cuerpo (**C**) del núcleo caudado. El asterisco dentro del dibujo esquemático incluido en cada microfotografía indica la posición del estriosoma. En **A**, se observa cómo las interneuronas son abundantes en la periferia estriosomal, así como en los límites entre los distintos compartimentos. En **B**, las neuronas pueblan en menor medida el interior del estriosoma, aunque siguen apareciendo en gran número entre la matriz y el estriosoma. En **C**, la situación es parecida, aunque el número de neuronas en relación con el “parche” es menor. **Barra de calibración:** 750  $\mu\text{m}$  (**A**), 800  $\mu\text{m}$  (**B**), 260  $\mu\text{m}$  (**C**).

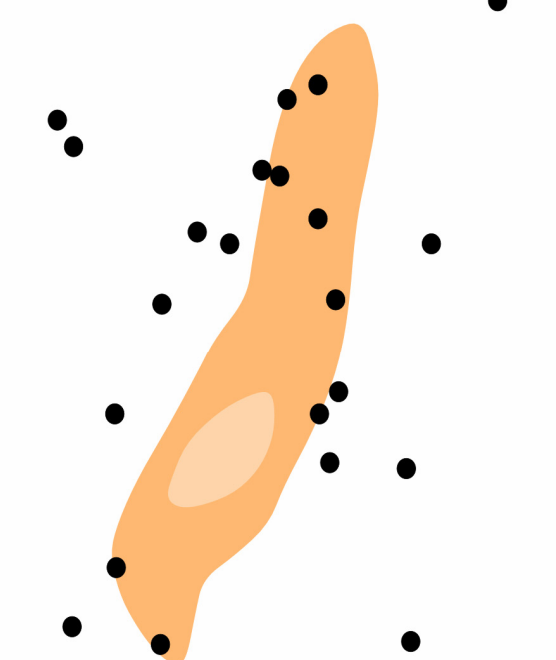
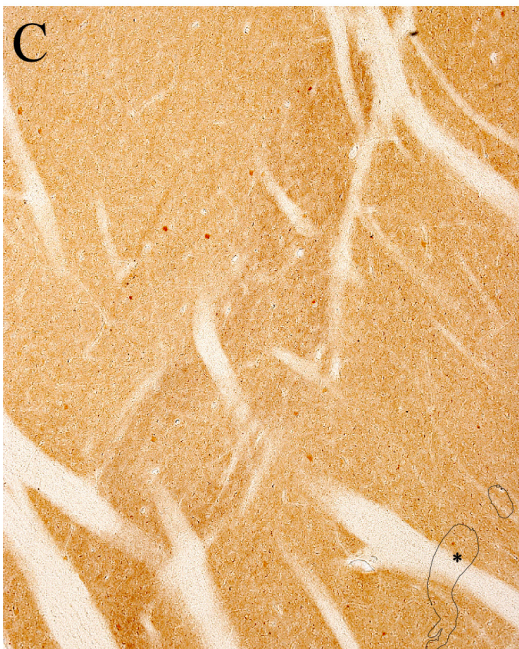
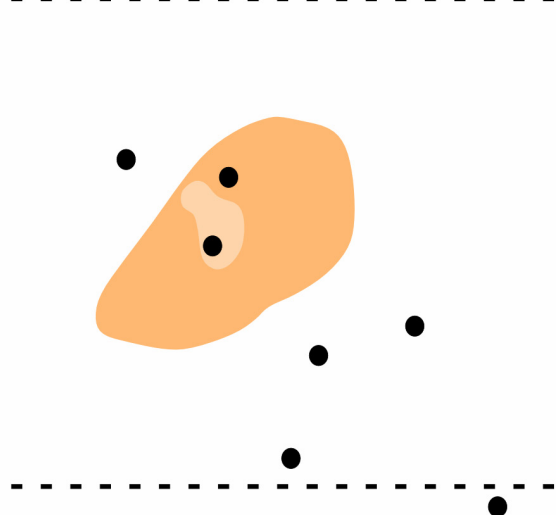
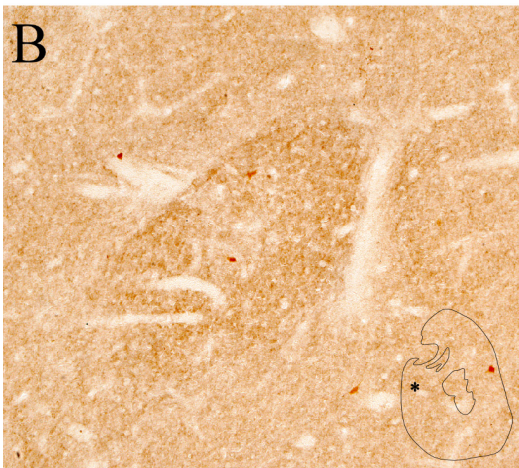
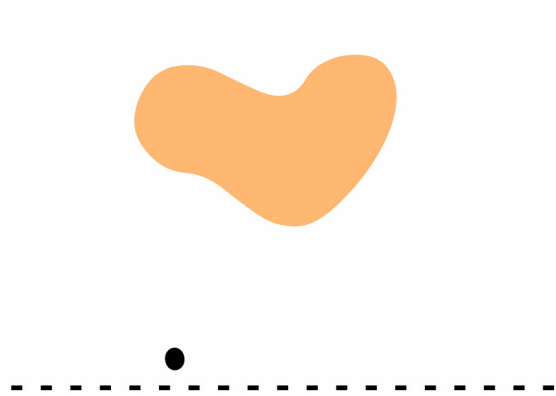
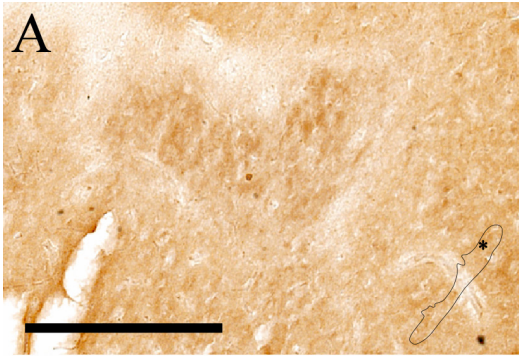






**FIGURA 28**

**Figura 28. Organización compartimental de las interneuronas colinérgicas en el giro del núcleo caudado y en el putamen.** Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de las interneuronas colinérgicas con respecto a los estriosomas, revelados con encefalina, en el giro del núcleo caudado (**A**), y en el putamen precomisural (**B**) y postcomisural (**C**). El asterisco dentro del dibujo esquemático incluido en cada microfotografía indica la posición del estriosoma. En **A**, se observa cómo el estriosoma aparece desprovisto de interneuronas. En **B**, las neuronas pueblan los distintos compartimentos, aunque en bajo número. En **C**, las neuronas son abundantes en la periferia del estriosoma, pero no pueblan el centro. Además, son numerosas en los límites entre la matriz y el estriosoma. **Barra de calibración:** 1 mm (A y C), 1,5 mm (B).

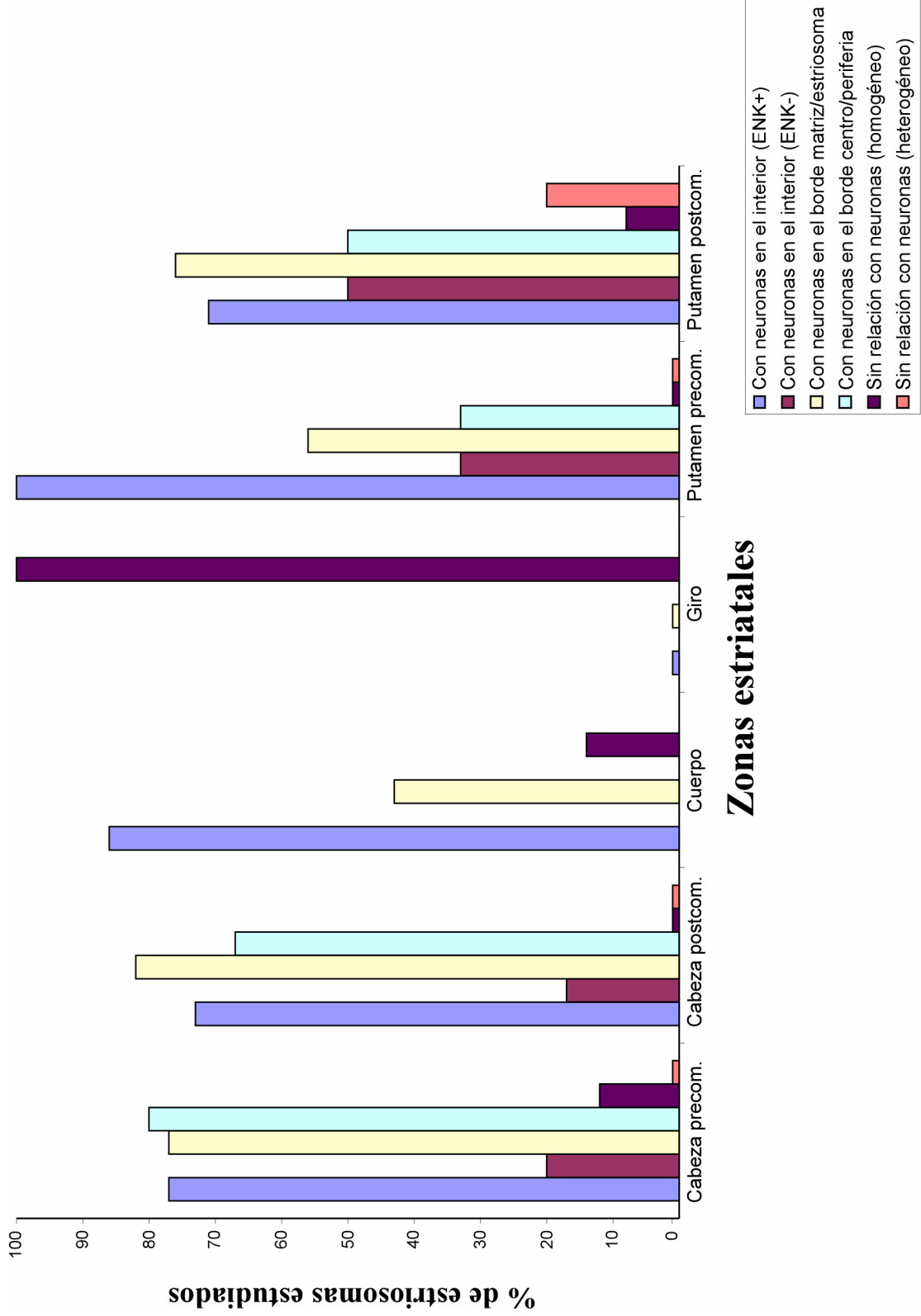




**FIGURA 29**

**Figura 29. Análisis cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas colinérgicas.** Gráfico de barras que indica, para las distintas regiones del estriado, el porcentaje de estriosomas que cumplieron cada una de las condiciones citadas en la leyenda. Las interneuronas aparecen especialmente en la región de los estriosomas con una alta inmunorreactividad frente a la encefalina en todas las regiones, excepto en el giro del núcleo caudado, donde no se observa ningún estriosoma que contenga interneuronas. Las neuronas colinérgicas pueblan preferentemente el borde entre la matriz y el estriosoma, aunque también aparecen entre el centro y la periferia. **Abreviaciones:** *ENK*, encefalina; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural.

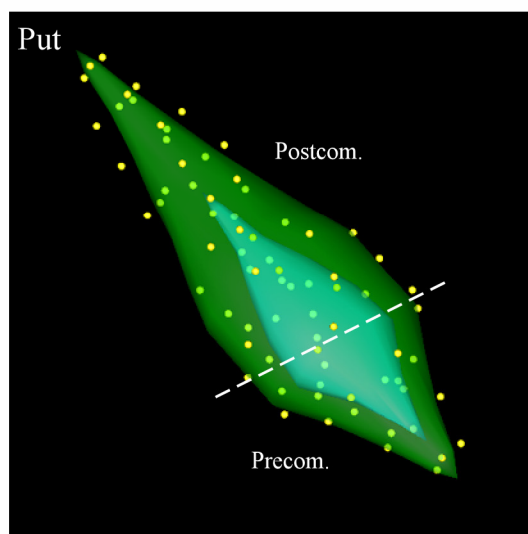
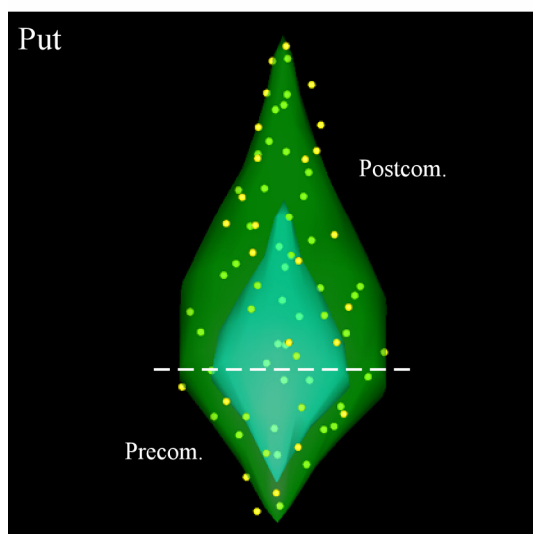
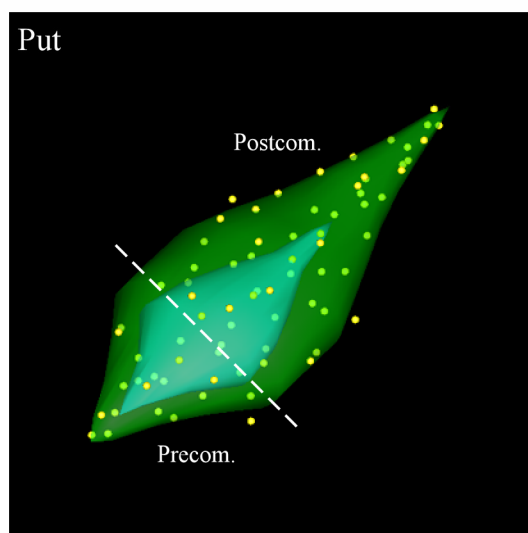
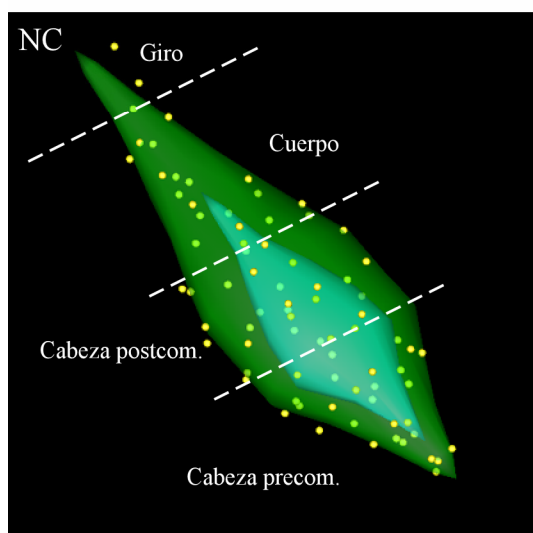
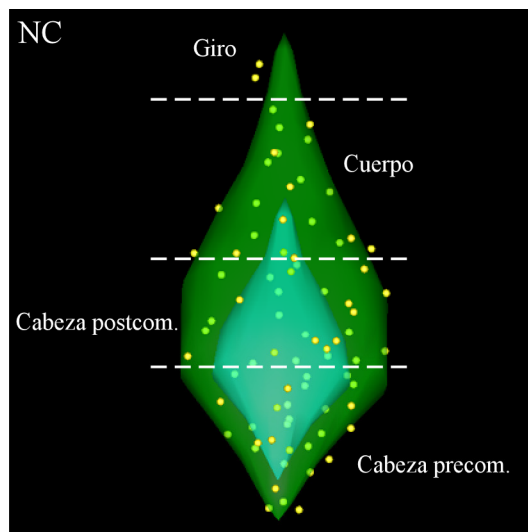
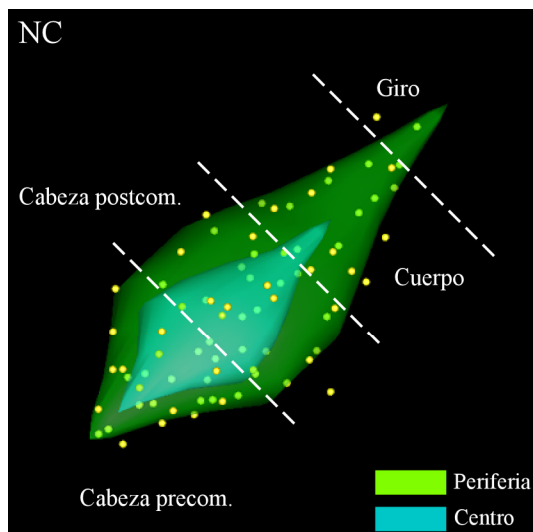






**FIGURA 30**

**Figura 30. La organización compartimental de las interneuronas colinérgicas es heterogénea a lo largo del eje anteroposterior del estriado.** Esquemas tridimensionales que ilustran la organización compartimental de las interneuronas colinérgicas. Las tres primeras imágenes muestran diferentes vistas de un estriosoma esquemático situado en las distintas regiones del NC, mientras que las tres últimas se aplican a un estriosoma localizado en el Put. Las interneuronas pueblan de un modo similar las regiones precomisural y postcomisural de la cabeza del NC, apareciendo en los distintos compartimentos del estriosoma, con preferencia por la periferia. En el cuerpo del NC el patrón de distribución es similar, aunque las interneuronas aparecen en menor número. Por último, en el giro del NC las neuronas colinérgicas no aparecen en el interior del estriosoma. En el Put, las interneuronas ocupan los distintos territorios químicos tanto en la región precomisural como en la postcomisural, aunque son más abundantes en la segunda. **Abreviaciones:** *NC*, núcleo caudado; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *Put*, putamen.

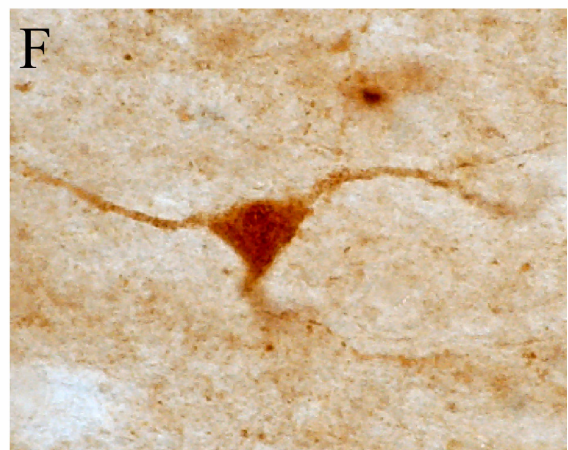
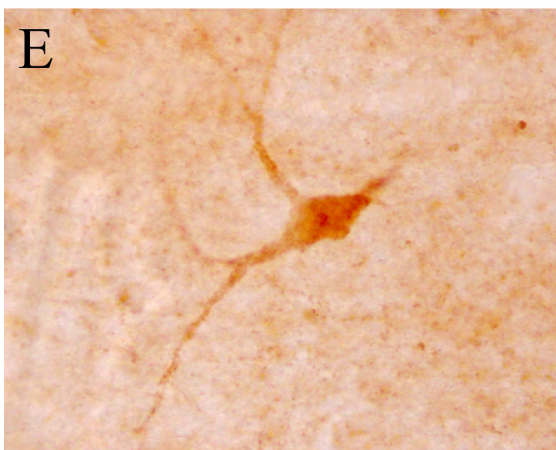
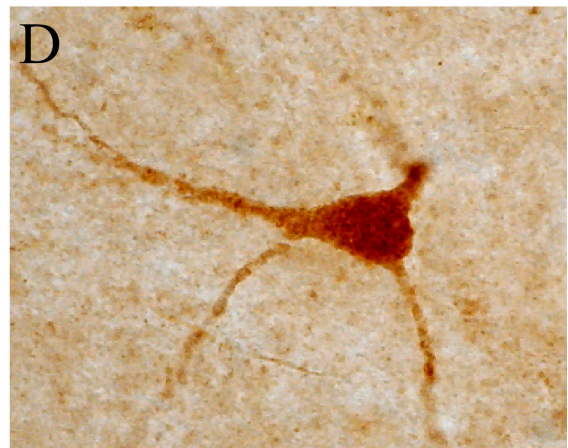
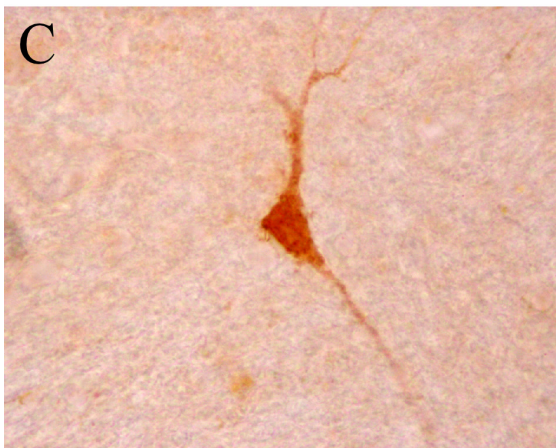
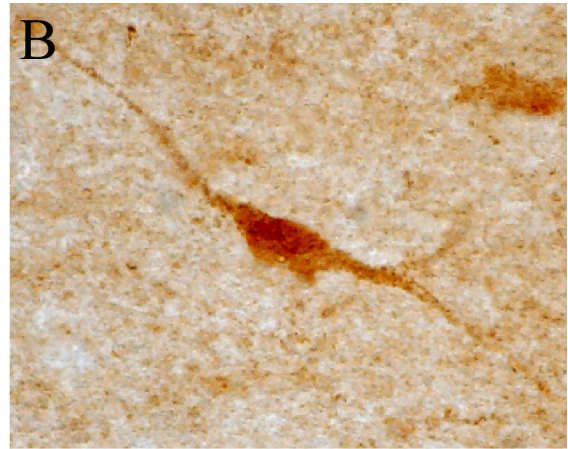
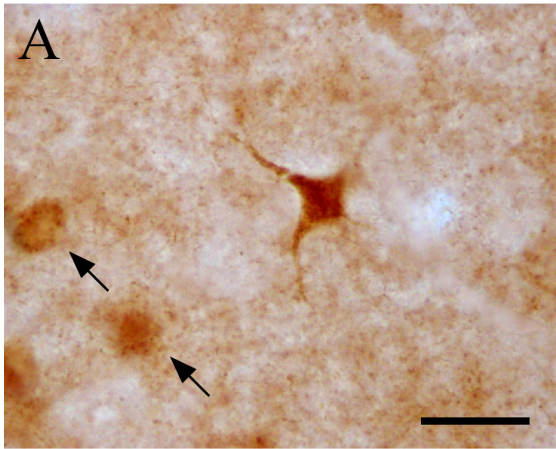




**FIGURA 31**

**Figura 31. Diversidad morfológica de las interneuronas calbindina positivas.** Grupo de microfotografías que ilustran la diversidad morfológica de las interneuronas calbindina positivas del estriado. En **A**, se observa una neurona de soma poligonal con cuatro ramificaciones primarias; las flechas señalan el soma de dos neuronas de proyección teñidas con esta técnica inmunohistoquímica. En **B** y **E**, se muestran dos neuronas de soma alargado o fusiforme con dos (**B**) y tres (**E**) dendritas primarias; en **C** y **F**, aparecen dos neuronas de soma triangular con tres prolongaciones primarias, mientras que en **D**, se ilustra una neurona de soma ovoide o globular con tres ramificaciones primarias. **Barra de calibración:** 20  $\mu\text{m}$ .







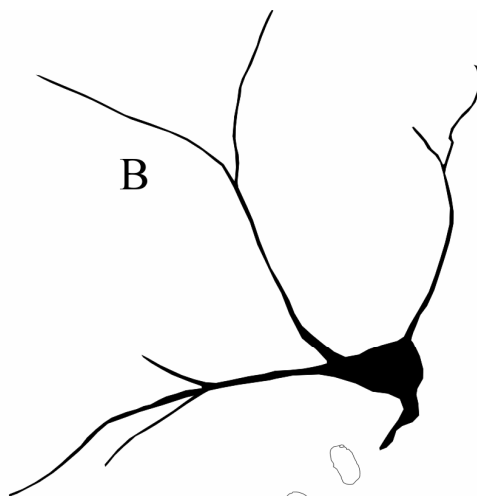
**FIGURA 32**

**Figura 32. Morfología somatodendrítica de las interneuronas calbindina positivas.** Dibujos realizados con cámara clara que ilustran las características somatodendríticas de algunas interneuronas estriatales calbindina positivas. **A** y **B** corresponden a las neuronas fotografiadas en A y D en la *Figura 31*, respectivamente, mientras que **C** y **D** corresponden a aquellas ilustradas en E y F de la citada figura. El punto en los esquemas que acompañan a cada dibujo muestra la localización de las neuronas en el estriado. Barra de calibración: 25  $\mu\text{m}$ .

A



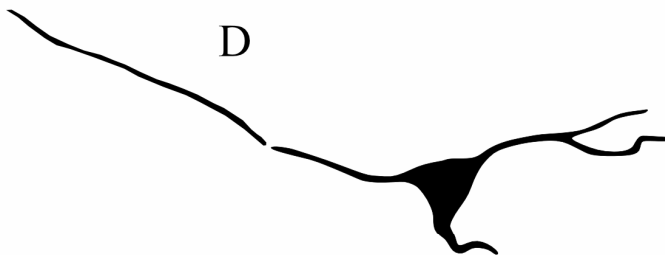
B



C



D

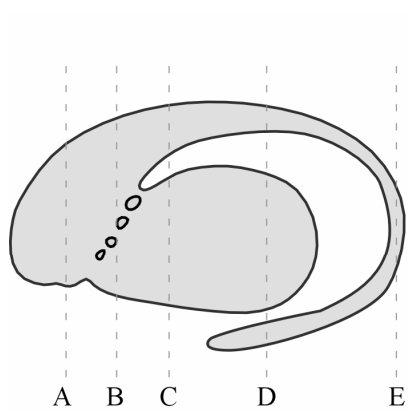




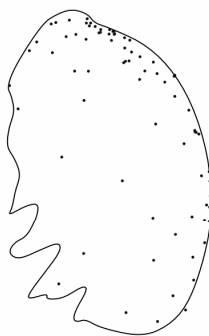
**FIGURA 33**

**Figura 33. Distribución de las interneuronas calbindina positivas en algunas secciones del estriado humano.** Dibujos realizados con el sistema Neurolucida que ilustran la distribución de las interneuronas calbindina positivas en cinco cortes coronales del estriado, ordenados de anterior a posterior (A-E). Las líneas discontinuas en el esquema sagital del estriado indican los niveles a los que corresponden las secciones coronales. Cada punto representa una neurona. **Barra de calibración:** 5 mm.





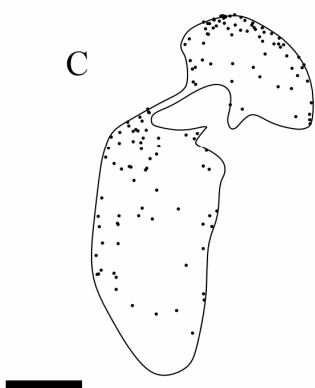
A



B



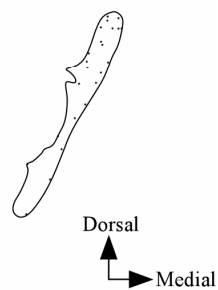
C



D



E

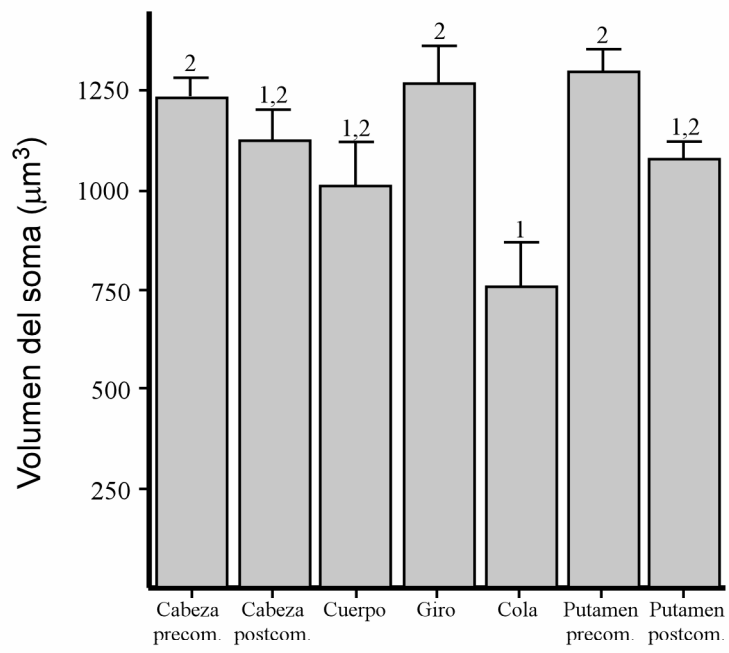




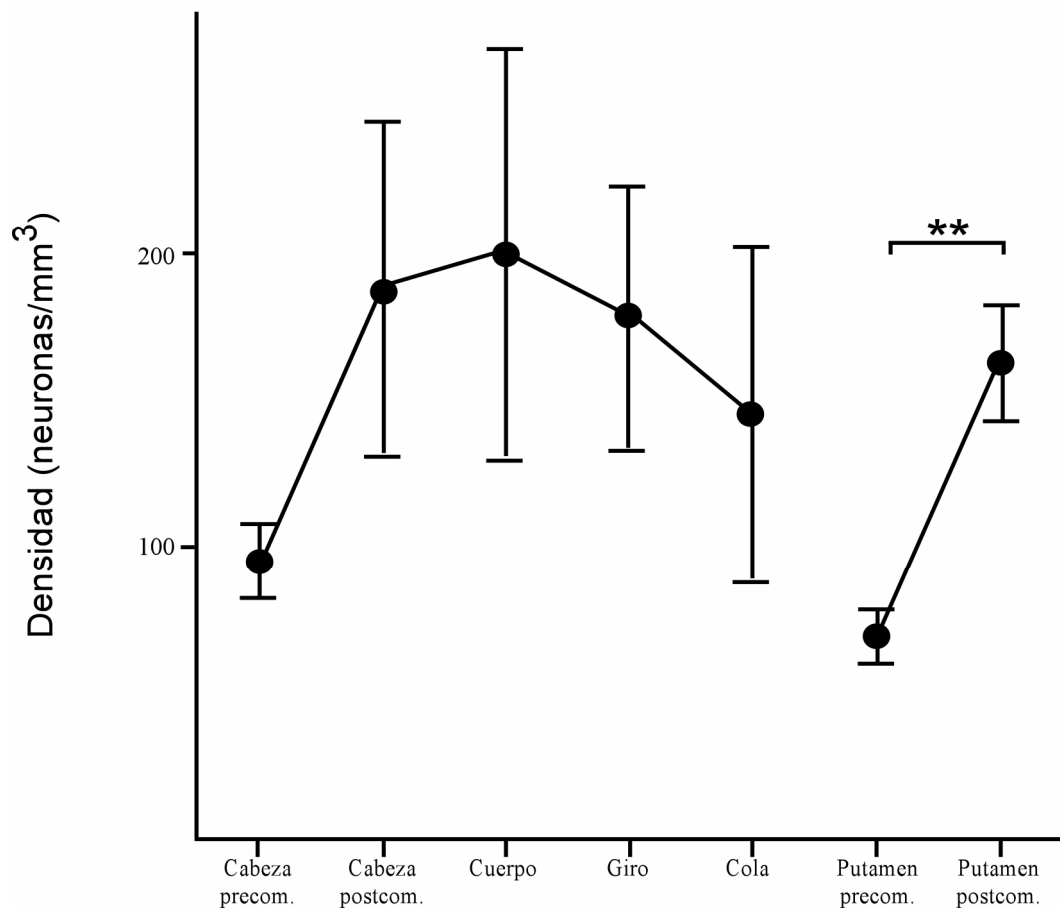
**FIGURA 34**

**Figura 34. Volumen del soma y distribución de las interneuronas calbindina positivas en el eje anteroposterior del estriado.** En **A**, se muestra un gráfico de barras que pone de manifiesto el diferente volumen del soma de las interneuronas calbindina positivas en algunas regiones del estriado humano. El putamen precomisural es la región con neuronas de mayor tamaño seguido del giro del núcleo caudado, las regiones precomisural y postcomisural de la cabeza del núcleo caudado, el putamen postcomisural, el cuerpo y la cola del núcleo caudado (**A**). En **B**, se presenta un gráfico de líneas que muestra la densidad de las neuronas calbindina positivas en las distintas regiones del estriado. Estas interneuronas ocupan preferentemente los territorios postcomisurales con respecto a los precomisurales, siendo esta diferencia especialmente llamativa entre las regiones precomisural y postcomisural de la cabeza del núcleo caudado, y entre el putamen precomisural y postcomisural, donde aparecen diferencias estadísticas muy significativas (**B**). La cola del núcleo caudado es la región postcomisural con menor densidad neuronal. \*\* indica diferencias muy significativas ( $P < 0,01$ ); los números sobre las barras en **A**, indican los grupos obtenidos en la prueba estadística a posteriori *Tukey B*. **Abreviaciones:** *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural.

A



B

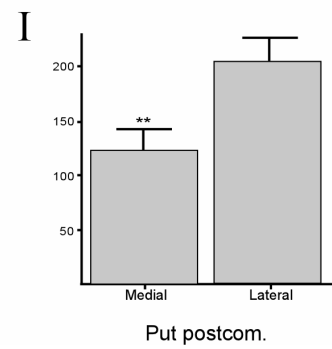
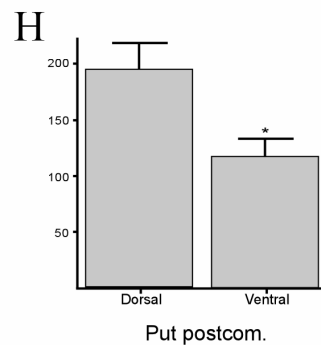
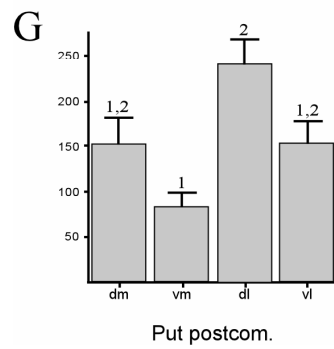
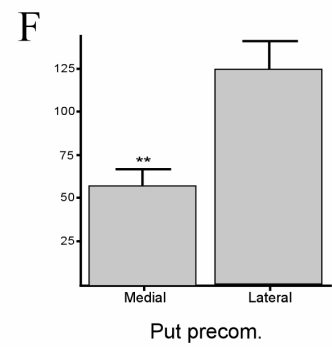
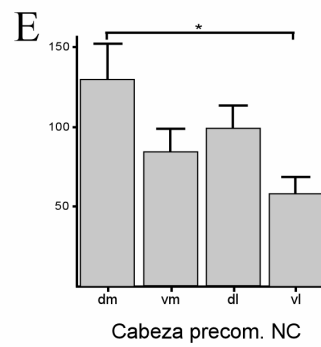
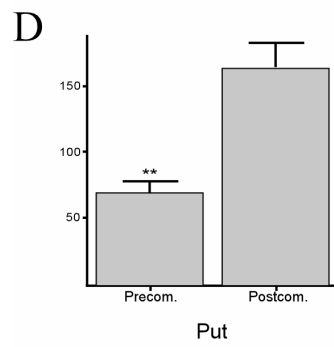
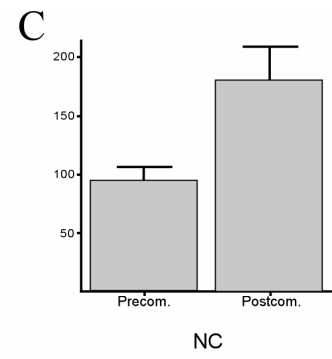
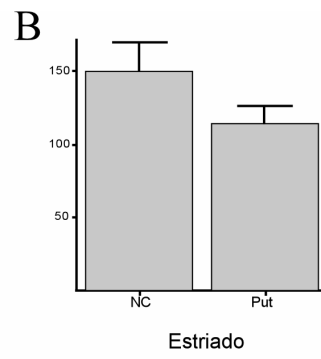
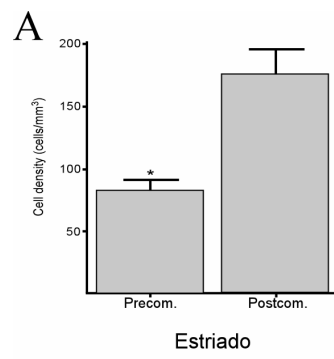




**FIGURA 35**

**Figura 35. Distribución de las interneuronas calbindina positivas en los ejes dorsoventral y mediolateral.** Gráficos de barras que comparan la densidad de las interneuronas calbindina positivas en el estriado precomisural y postcomisural (**A**), en el NC y el Put (**B**), en los territorios precomisurales y postcomisurales de estas dos estructuras subcorticales (**C** y **D**), en distintos sectores de la cabeza precomisural del NC (**E**), y en el Put precomisural (**F**) y postcomisural (**G-I**). Estas interneuronas son más abundantes en las regiones postcomisurales de los dos núcleos (**A**, **C** y **D**), y en el NC con respecto al Put (**B**), aunque en este caso no aparecen diferencias estadísticas. En la cabeza precomisural del NC, el sector *dm* es el más densamente poblado, alcanzando diferencias significativas al compararlo con el sector *vl* (**E**). La mitad lateral del Put, tanto en su región precomisural (**F**) como en la postcomisural (**I**), presenta una mayor densidad neuronal que la mitad medial. Además, el sector *dl* del Put postcomisural contiene una densidad mucho mayor que el resto de los sectores (**G**). Esta diferencia también es evidente al comparar la mitad dorsal de esta región con respecto a la ventral (**H**). \* indica diferencias estadísticamente significativas ( $0,05 > P > 0,01$ ), y \*\* muy significativas ( $P < 0,01$ ); los números sobre las barras en **G** indican los grupos obtenidos en la prueba estadística a posteriori *Tukey B*. **Abreviaciones:** *dl*, dorsolateral; *dm*, dorsomedial; *NC*, núcleo caudado; *postcom.*, postcomisural; *Put*, putamen; *precom.*, precomisural; *vl*, ventrolateral; *vm*, ventromedial.

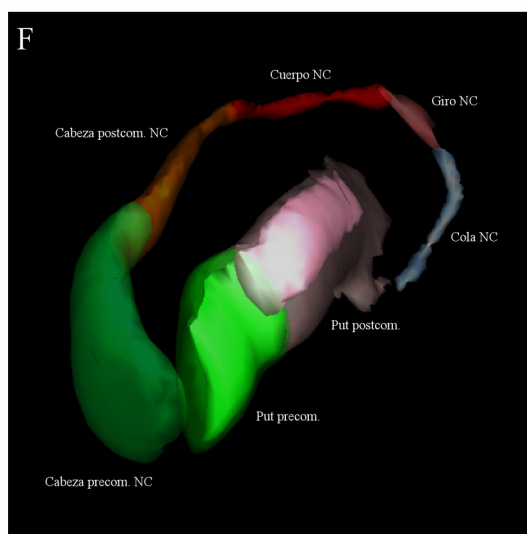
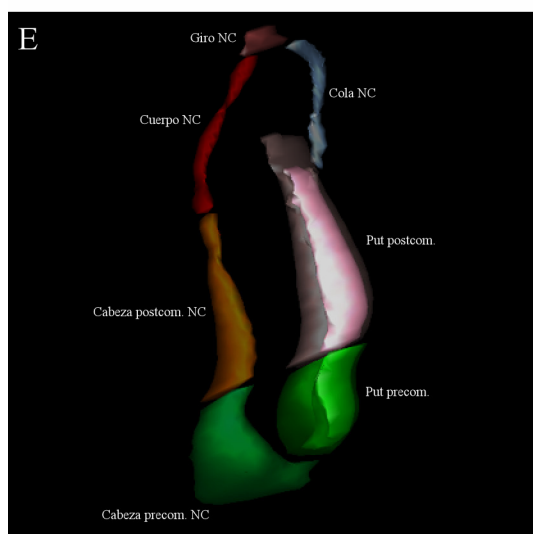
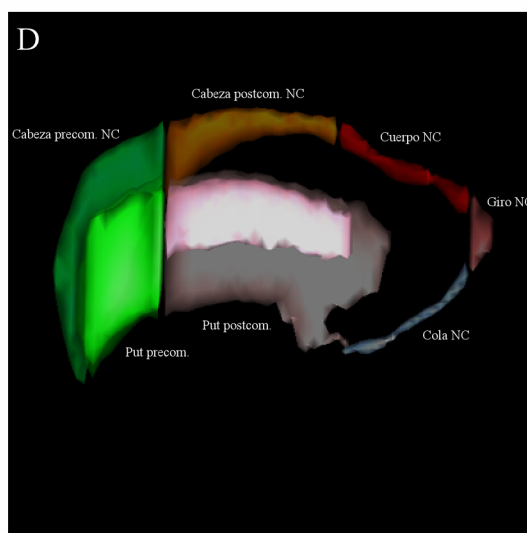
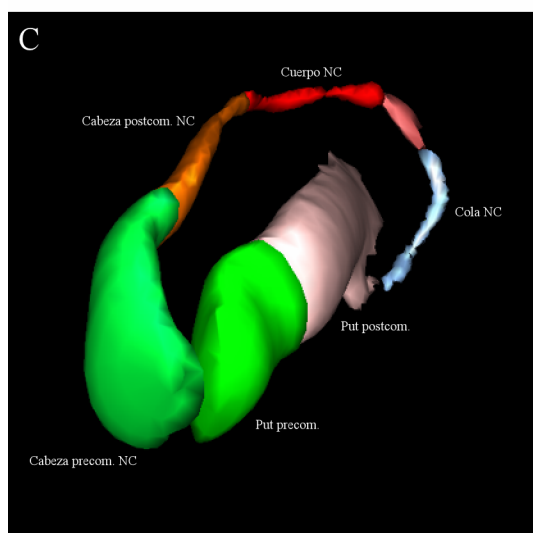
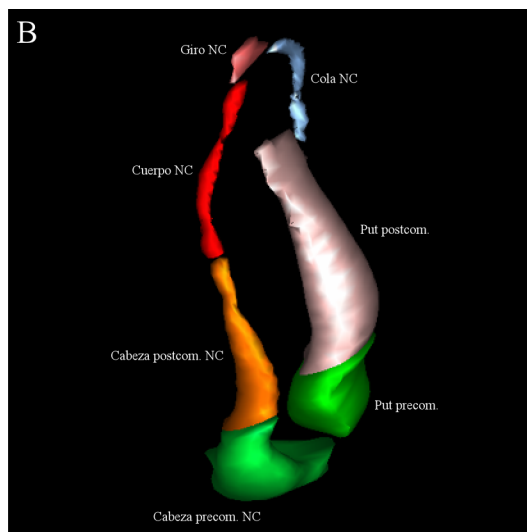
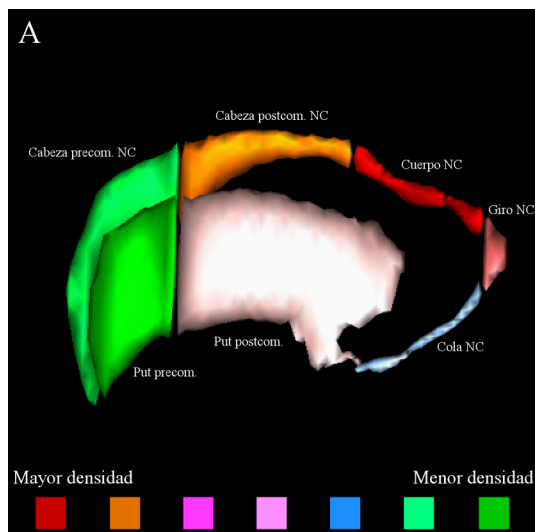






**FIGURA 36**

**Figura 36. La distribución de las interneuronas calbindina positivas es heterogénea en el estriado humano.** Esquema tridimensional que muestra la distribución selectiva de las interneuronas calbindina positivas a lo largo del eje anteroposterior del estriado (A-C). Además, en D-F, se ilustra la preferencia de estas interneuronas por ocupar ciertos sectores dentro de algunas de las regiones. Como expresa el código de colores, el cuerpo del NC es la región más densamente poblada, seguido de la cabeza postcomisural y el giro del NC, el Put postcomisural, la cola y la cabeza precomisural del NC, y el Put precomisural (A-C). Por otra parte, la mitad lateral del Put precomisural y el sector dorsolateral del Put postcomisural tienen una mayor densidad dentro de cada región, presentando diferencias estadísticas con respecto al resto de territorios incluidos en la zona estriatal correspondiente. **Abreviaciones:** NC, núcleo caudado; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *Put*, putamen.

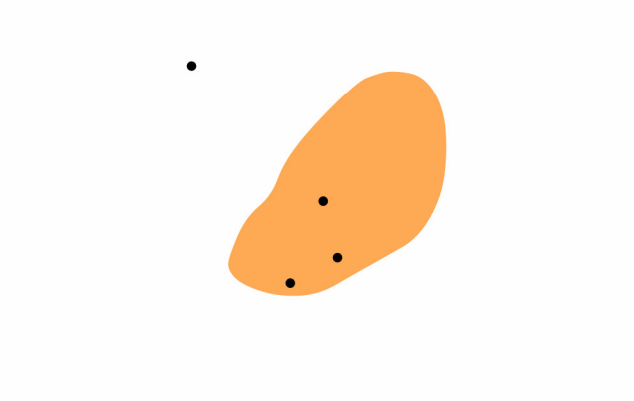
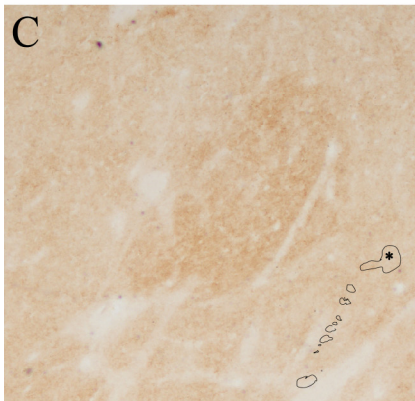
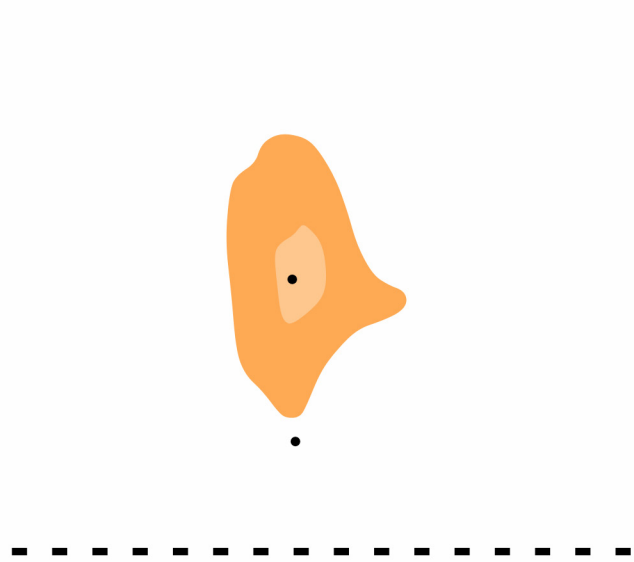
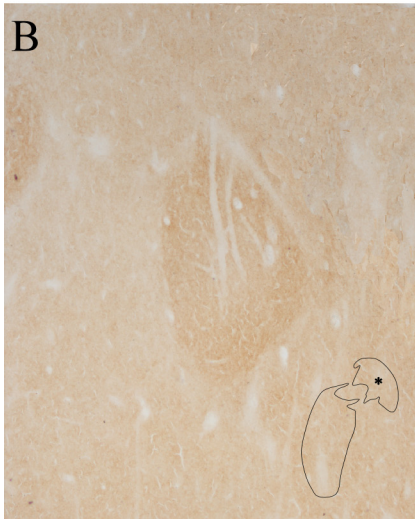
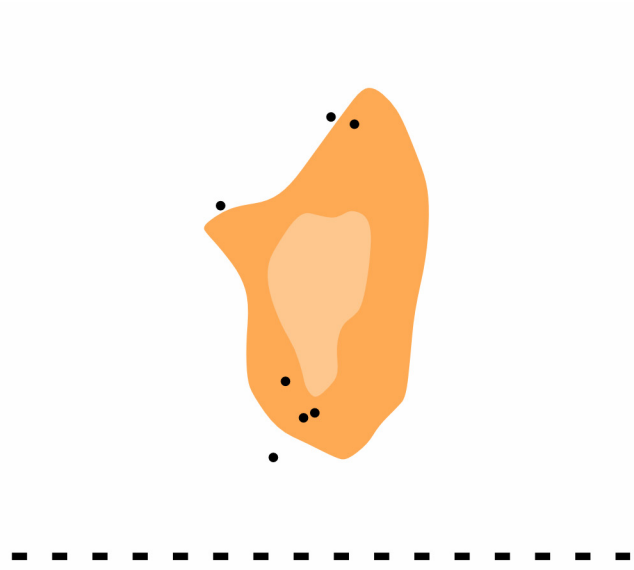
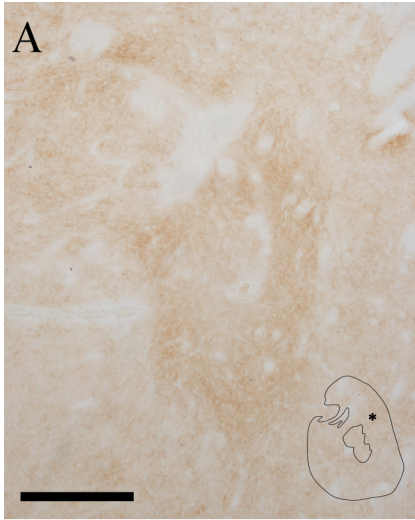




**FIGURA 37**

**Figura 37. Organización compartimental de las interneuronas calbindina positivas en la cabeza y el cuerpo del núcleo caudado.** Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de las interneuronas calbindina positivas con respecto a los estriosomas, revelados con encefalina, en la cabeza precomisural (**A**) y postcomisural (**B**), y en el cuerpo (**C**) del núcleo caudado. En este caso, la posición de las interneuronas se estudió en cortes adyacentes, por lo que las microfotografías muestran únicamente los estriosomas. El asterisco dentro del dibujo esquemático incluido en cada microfotografía indica la posición del estriosoma. En **A**, se observa cómo las interneuronas están en la periferia estriosomal, y aparecen próximas a los bordes de los distintos compartimentos. En **B**, sólo aparece una interneurona dentro del estriosoma, ocupando el centro. En **C**, se observan varias interneuronas en el interior del “parche”, y una de ellas podría quedar en el borde entre los distintos compartimentos. **Barra de calibración:** 500  $\mu\text{m}$  (A y B), 750  $\mu\text{m}$  (C).

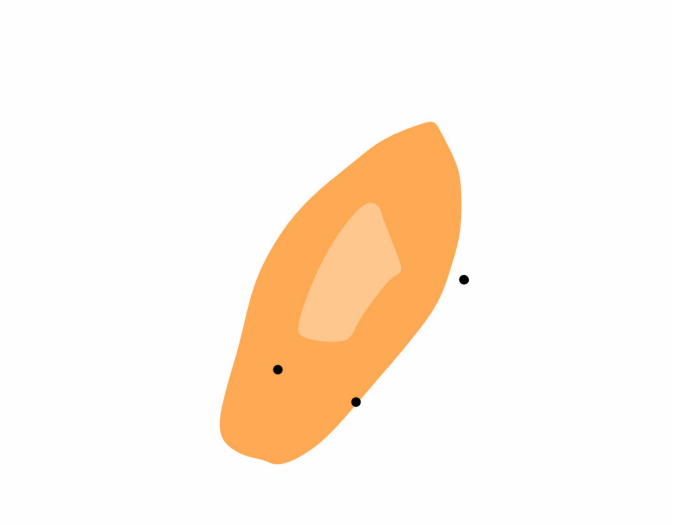
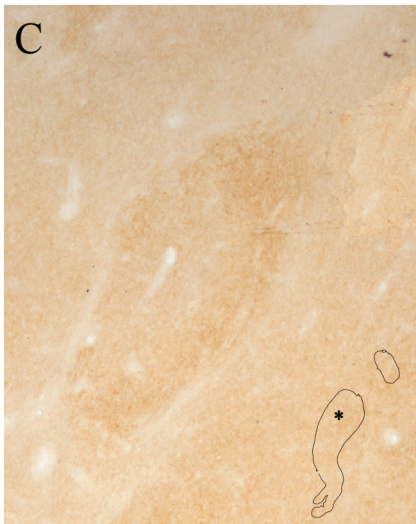
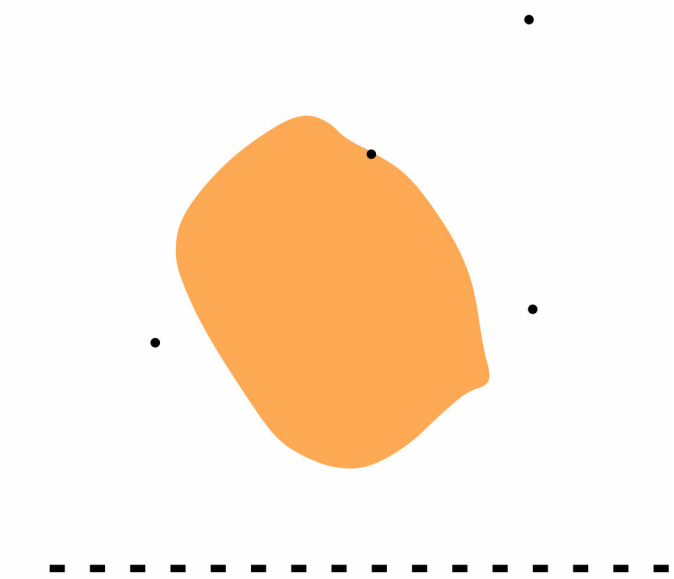
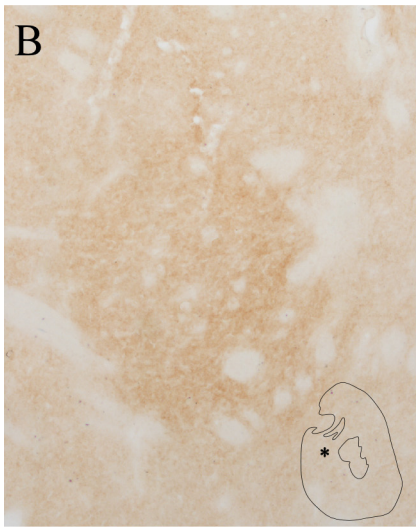
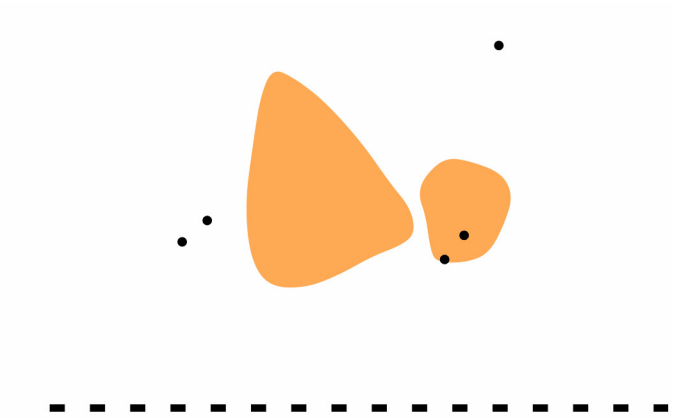
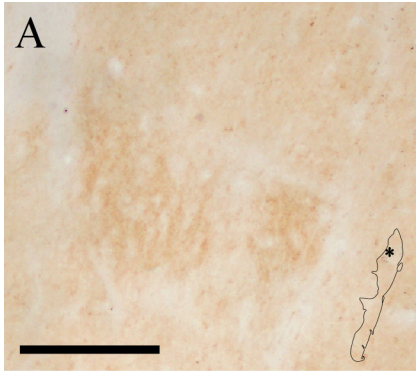






**FIGURA 38**

**Figura 38. Organización compartimental de las interneuronas calbindina positivas en el giro del núcleo caudado y en el putamen.** Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de las interneuronas calbindina positivas con respecto a los estriosomas, revelados con encefalina, en el giro del núcleo caudado (**A**), y en el putamen precomisural (**B**) y postcomisural (**C**). En este caso, la posición de las interneuronas se estudió en cortes adyacentes, por lo que las microfotografías muestran únicamente los estriosomas. El asterisco dentro del dibujo esquemático incluido en cada microfotografía indica la posición del estriosoma. En **A**, se observa una interneurona en el interior y otra en el borde del estriosoma. En **B**, el estriosoma aparece desprovisto de neuronas, aunque hay una en el borde entre el “parche” y la matriz. En **C**, se observa una interneurona en la periferia estriosomal y otra en el borde entre la periferia y la matriz. Además, la otra neurona que aparece en el dibujo podría quedar en el límite entre ambos compartimentos. **Barra de calibración:** 860  $\mu\text{m}$  (A), 500  $\mu\text{m}$  (B y C).

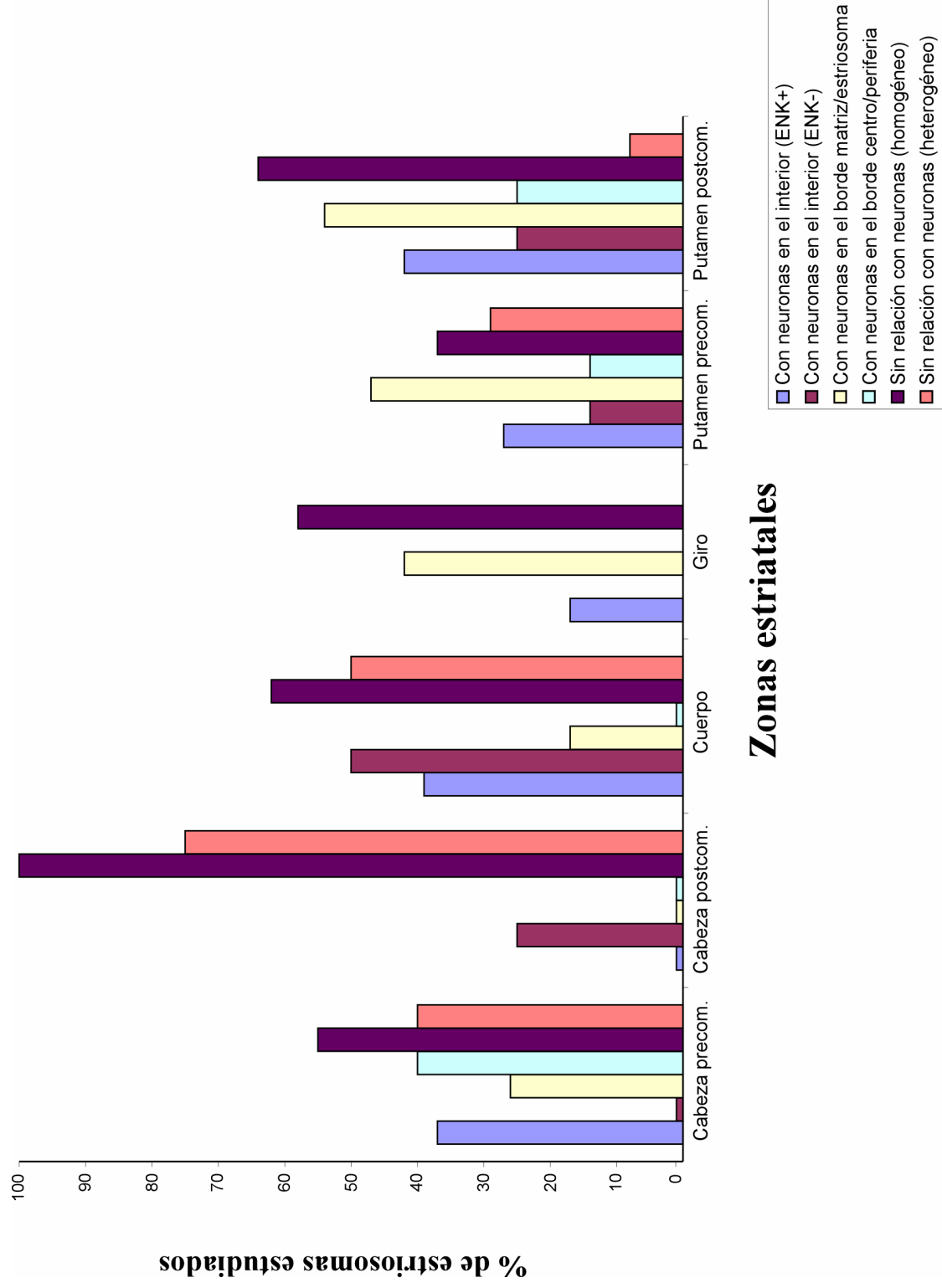




**FIGURA 39**

**Figura 39. Análisis cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas calbindina positivas.** Gráfico de barras que indica, para las distintas regiones del estriado, el porcentaje de estriosomas que cumplieron cada una de las condiciones citadas en la leyenda. Debido al escaso número de estas interneuronas, el porcentaje de estriosomas que tienen relación con ellas es bajo. En la cabeza precomisural del núcleo caudado, aparecen estriosomas con interneuronas en las distintas localizaciones, salvo en el centro estriosomal. Curiosamente, a niveles más posteriores de la cabeza del núcleo caudado, las interneuronas calbindina positivas parecen encontrarse únicamente en el centro de los estriosomas. En el cuerpo de este núcleo, los somas aparecen tanto en el centro como en la periferia, y además ocupan el borde entre la matriz y el estriosoma. En el giro del núcleo caudado algunos estriosomas contienen interneuronas en su interior, y una mayor proporción de ellos presentan somas en sus límites con la matriz. Con respecto al putamen, la distribución compartimental de estas interneuronas es homogénea en los territorios precomisurales y en los postcomisurales, aunque en los segundos la proporción de los estriosomas en relación con las interneuronas es mayor. En ambos casos aparecen neuronas en el centro y en la periferia estriosomal, y en los límites entre los distintos compartimentos. **Abreviaciones:** *ENK*, encefalina; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural.

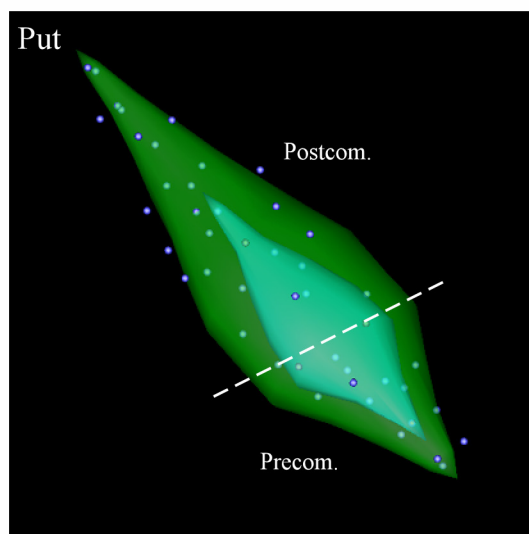
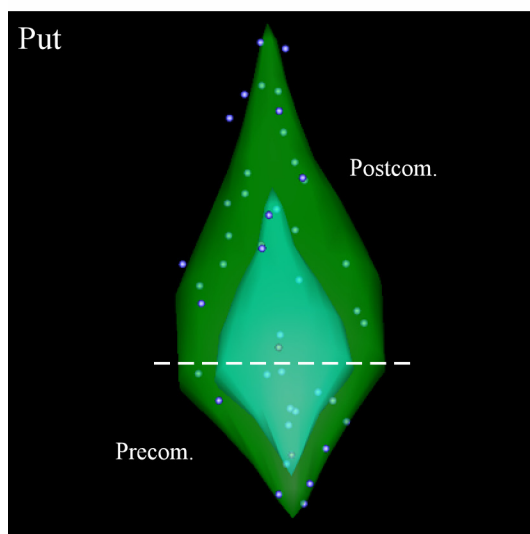
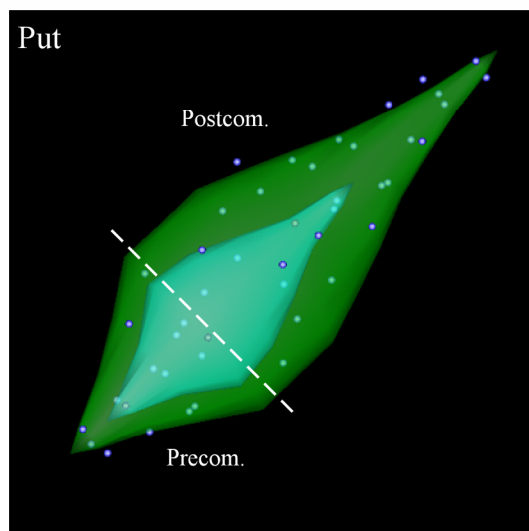
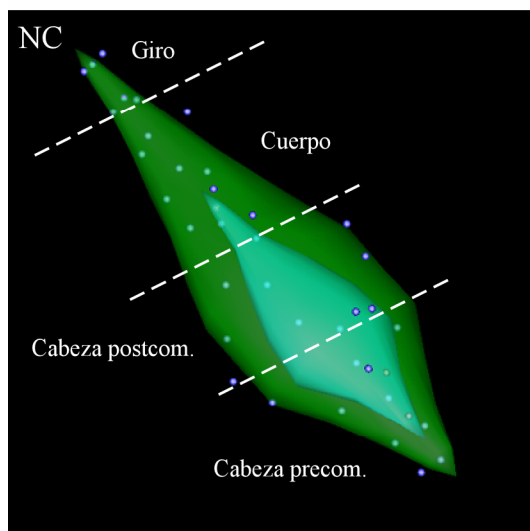
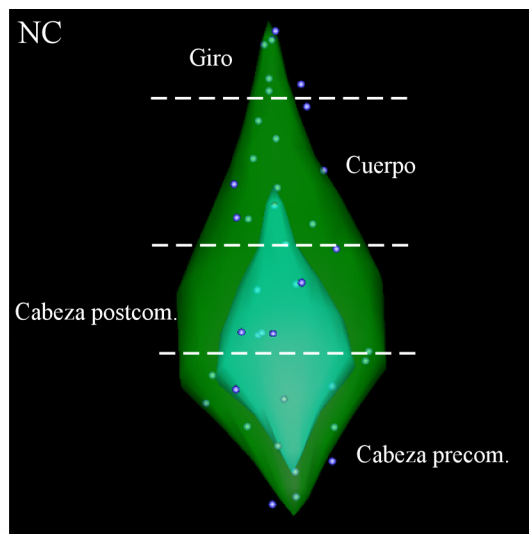
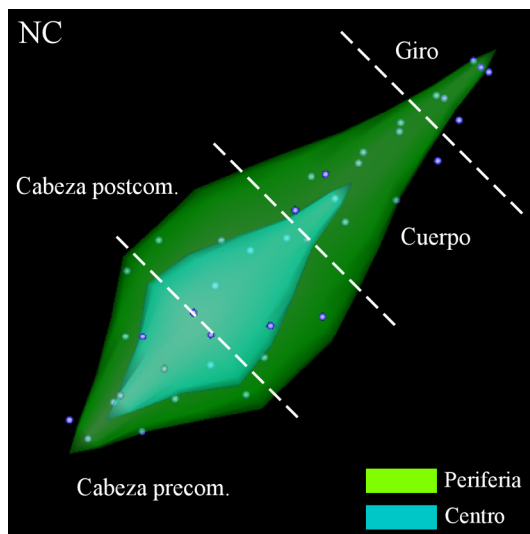






**FIGURA 40**

**Figura 40. La organización compartimental de las interneuronas calbindina positivas es heterogénea a lo largo del eje anteroposterior del estriado.** Esquemas tridimensionales que ilustran la organización compartimental de las interneuronas calbindina positivas. Las tres primeras imágenes muestran diferentes vistas de un estriosoma esquemático situado en las distintas regiones del NC, mientras que las tres últimas se aplican a un estriosoma localizado en el Put. Las interneuronas aparecen en la periferia y en los bordes entre el centro y la periferia en la cabeza precomisural del núcleo caudado. Sin embargo, en la porción postcomisural de esta región estriatal, son más frecuentes en el centro estriosomal. En el cuerpo del NC, la mayoría de las neuronas aparecen en el interior del estriosoma, mientras que en el giro de este núcleo tienden a ocupar los límites entre la matriz y el estriosoma. En el Put, la distribución de las interneuronas calbindina positivas con respecto a los estriosomas es bastante homogénea, aunque el número de somas en la porción postcomisural es mayor que en la precomisural. En ambos casos aparecen interneuronas en el centro y la periferia estriosomal, y en los límites entre ambos compartimentos, y entre la matriz y el estriosoma. **Abreviaciones:** *NC*, núcleo caudado; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *Put*, putamen.



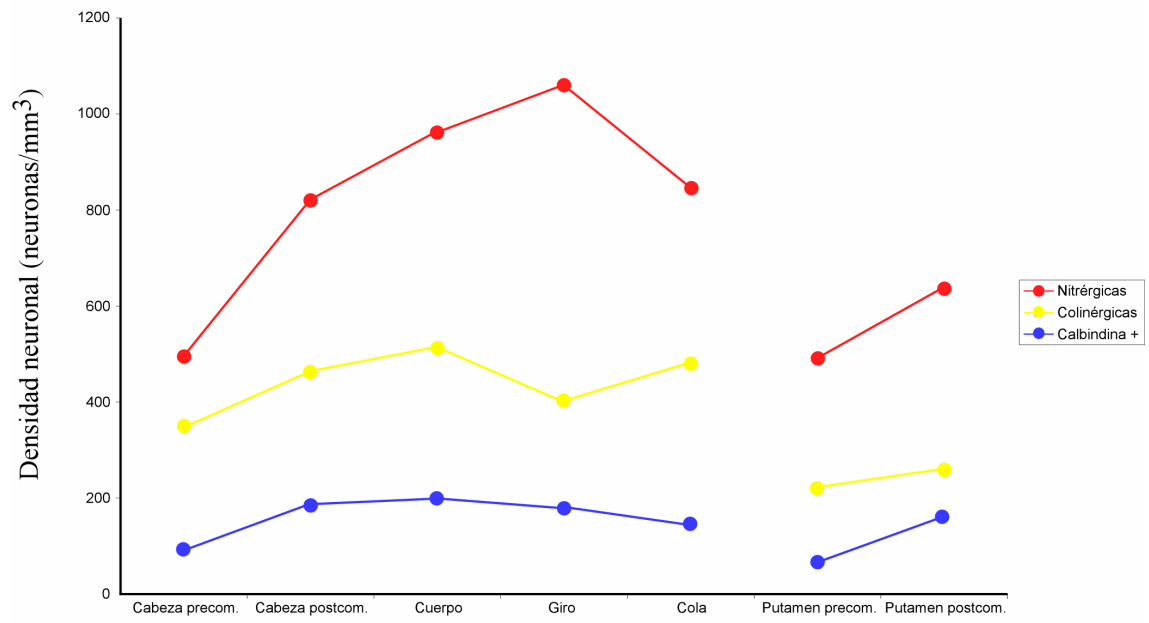


**FIGURA 41**

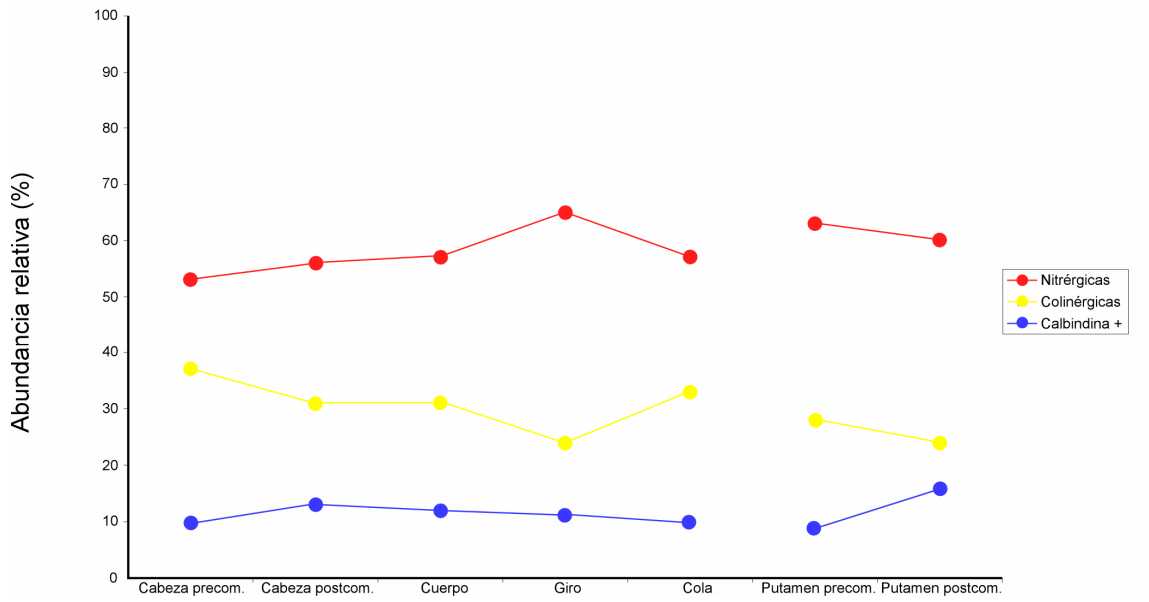
**Figura 41. Prevalencia de los tres tipos de interneuronas analizados en las distintas regiones del estriado.** Gráficos de líneas que ilustran la densidad de las interneuronas nitrérgicas, colinérgicas y calbindina positivas en las distintas regiones del estriado (**A**), y su abundancia relativa en estas regiones (**B**). En **A**, puede observarse cómo los tres tipos interneuronales aumentan su densidad en los territorios postcomisurales con respecto a los precomisurales, siendo este aumento más acusado en las interneuronas nitrérgicas y en las calbindina positivas, especialmente en el putamen. Además, las distintas regiones del núcleo caudado presentan una mayor densidad de interneuronas nitrérgicas y colinérgicas que las del putamen. Sin embargo, en el caso de las interneuronas calbindina positivas, el putamen postcomisural alcanza una densidad similar a la de los territorios postcomisurales del núcleo caudado. En **B**, se observa cómo las interneuronas nitrérgicas representan alrededor del 50% del total de las interneuronas estudiadas; las colinérgicas cerca del 25%; y las calbindina positivas un 10%. Estos porcentajes se mantienen bastante constantes en las distintas regiones del estriado humano, aunque en el giro del núcleo caudado las interneuronas nitrérgicas aumentan su abundancia relativa en detrimento de las colinérgicas. Además, en el putamen postcomisural, las interneuronas calbindina positivas aumentan su presencia y llegan a representar casi el 20%. **Abreviaciones:** *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural.



A



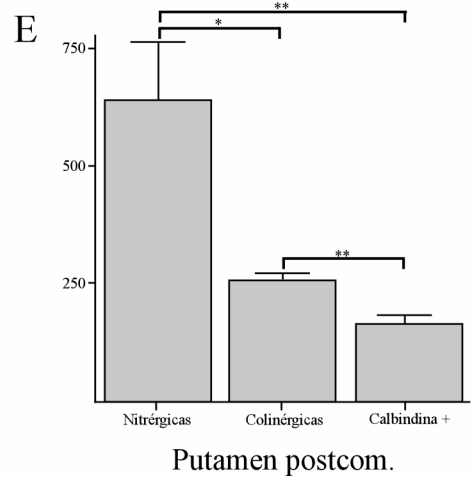
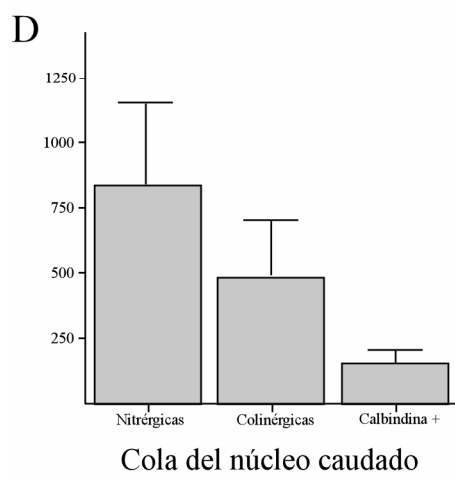
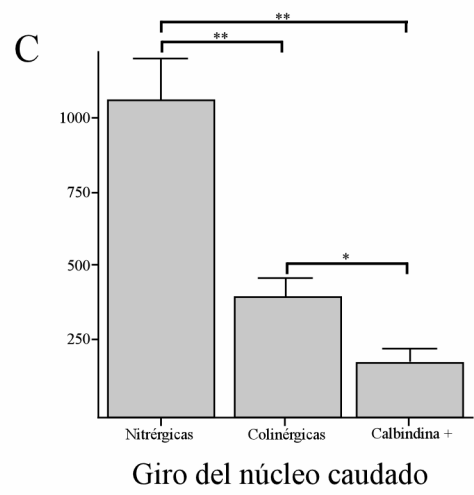
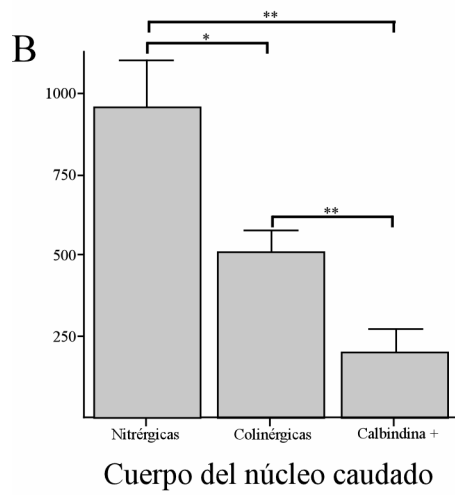
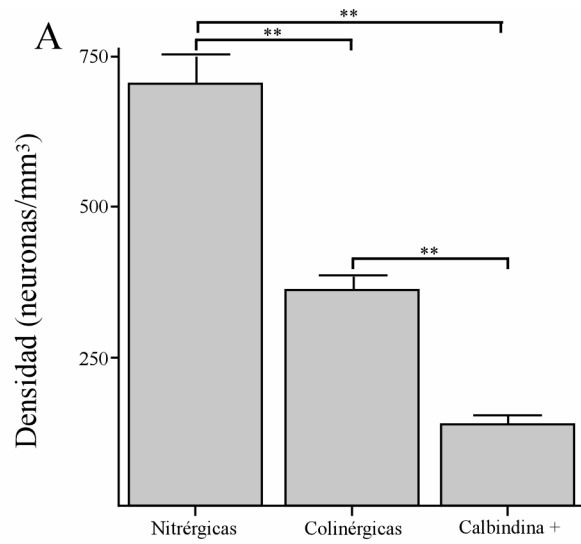
B





**FIGURA 42**

**Figura 42. Las diferencias entre las densidades de las tres poblaciones de interneuronas no son homogéneas a lo largo del eje anteroposterior del estriado.** Gráficos de barras que ilustran la densidad de las interneuronas nitrérgicas, colinérgicas y calbindina positivas en el estriado (**A**), y en algunas de sus regiones (**B-E**). En **A**, se muestra la densidad media de los distintos tipos neuronales en el conjunto del estriado y sus diferencias estadísticas, que son muy significativas en las tres comparaciones posibles. Este patrón se sigue en la cabeza del núcleo caudado y en el putamen precomisural. Sin embargo, aunque la relación entre las medias es similar en el cuerpo del núcleo caudado, sólo aparecen diferencias significativas entre las neuronas nitrérgicas y colinérgicas (**B**). En el giro del núcleo caudado, las medias de las interneuronas colinérgicas y las calbindina positivas se aproximan, encontrándose diferencias significativas entre ambas (**C**). La región en la que se observa una menor diferencia en las medias de las tres poblaciones de interneuronas es la cola del núcleo caudado, donde no se encuentran diferencias estadísticas (**D**). En el putamen postcomisural, la densidad de las interneuronas colinérgicas está próxima a la de las calbindina positivas. Pese a ello, las diferencias estadísticas entre ambas medias son muy significativas (**E**). \* indica diferencias estadísticamente significativas ( $0,05 > P > 0,01$ ), y \*\* muy significativas ( $P < 0,01$ ). **Abreviaciones:** *postcom.*, postcomisural.

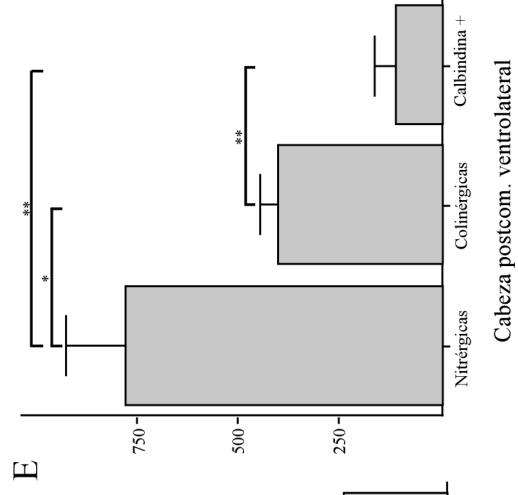
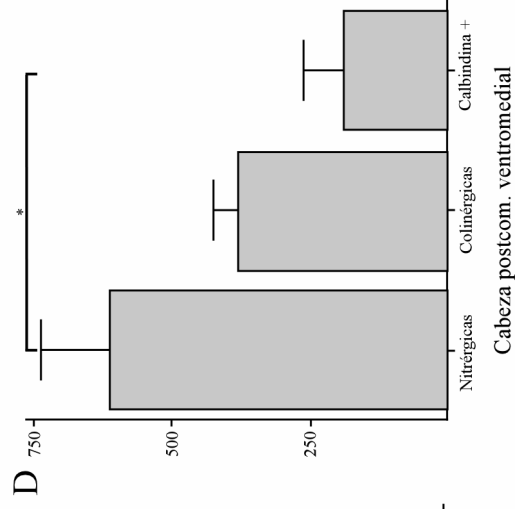
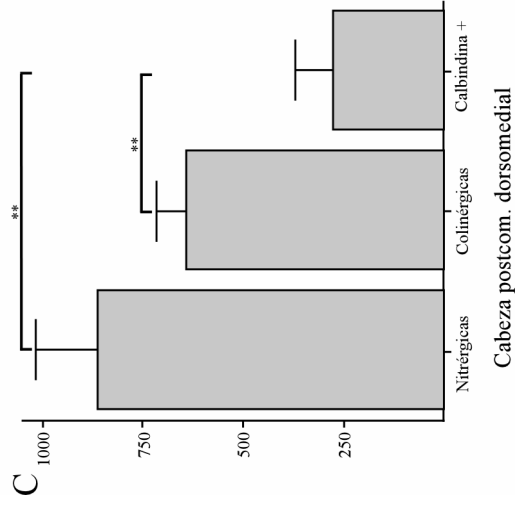
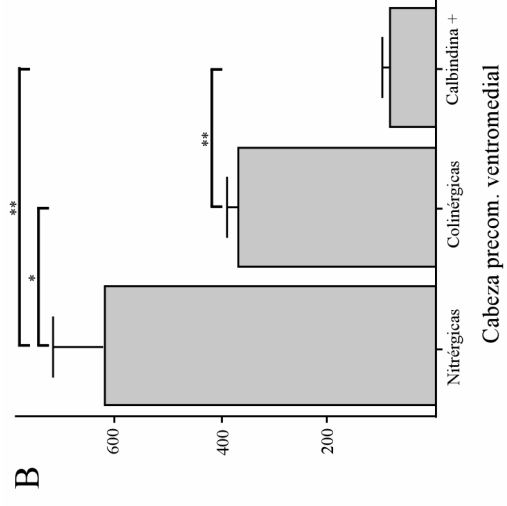
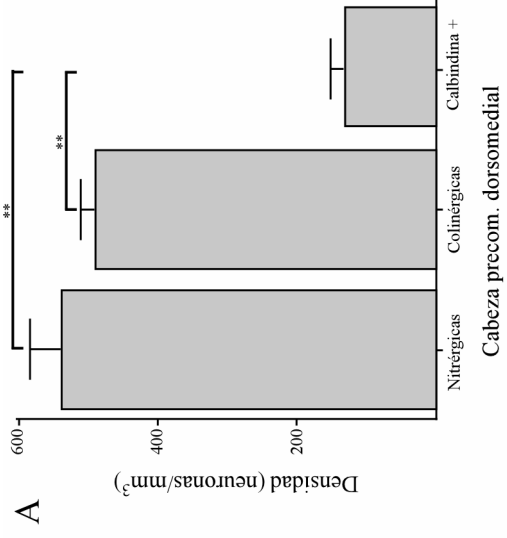




**FIGURA 43**

**Figura 43. Las diferencias entre las densidades de las tres poblaciones de interneuronas no son homogéneas en los ejes dorsoventral y mediolateral de la cabeza del núcleo caudado.** Gráficos de barras que ilustran la densidad de las interneuronas nitrérgicas, colinérgicas y calbindina positivas en aquellos sectores de la cabeza precomisural (**A** y **B**) y postcomisural (**C-E**) del núcleo caudado que no siguieron el patrón general de distribución y sus diferencias estadísticas, ilustradas en la *Figura 42A*. En **A** y en **C**, se observa cómo la media de las interneuronas nitrérgicas es muy similar a la de las colinérgicas, sin aparecer diferencias estadísticas entre ambas, en el sector dorsomedial de la cabeza precomisural (**A**) y postcomisural (**C**) del núcleo caudado. En el sector ventromedial de estas regiones, sin embargo, la diferencia entre las dos poblaciones de interneuronas es más acusada (**B** y **D**). En este cuadrante de la cabeza precomisural aparecen diferencias estadísticamente significativas (**B**); sin embargo, en la cabeza postcomisural no se aprecian estas diferencias estadísticas (**D**). Por último, en el sector ventrolateral de la cabeza postcomisural del núcleo caudado, la proporción entre las tres medias es similar a la del patrón general, pero las diferencias estadísticas entre las interneuronas nitrérgicas y las colinérgicas son únicamente significativas (**E**). \* indica diferencias estadísticamente significativas ( $0,05 > P > 0,01$ ), y \*\* muy significativas ( $P < 0,01$ ). **Abreviaciones:** *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural.

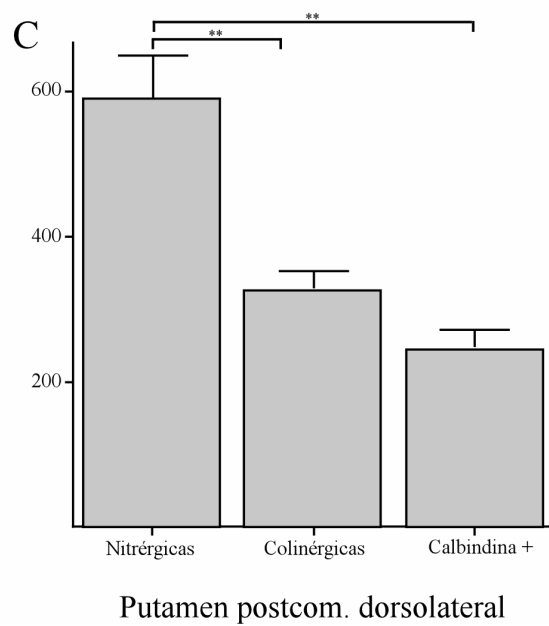
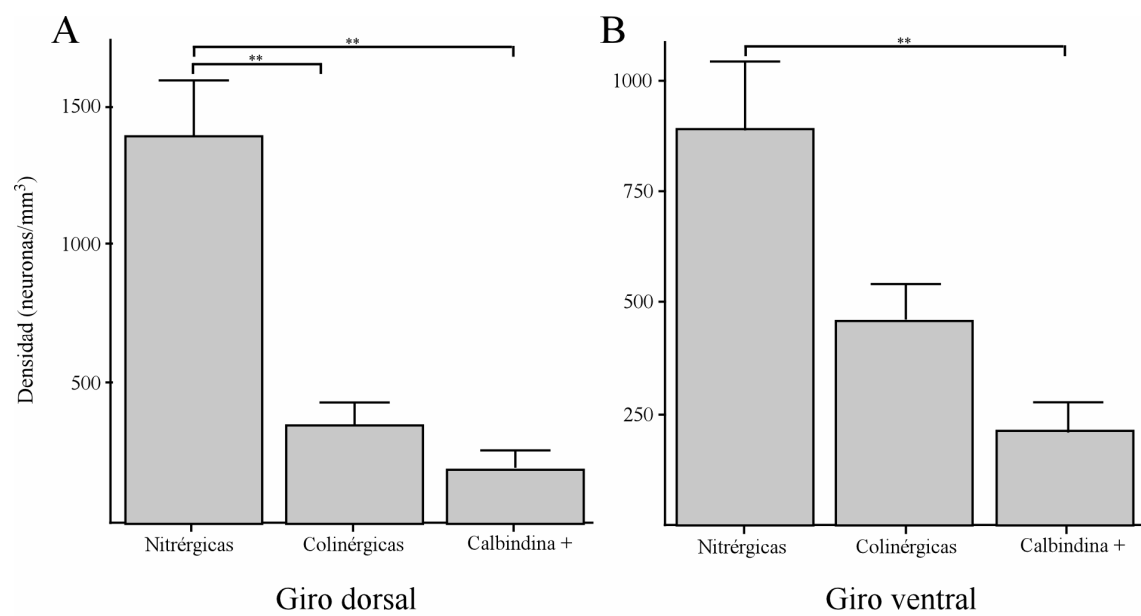






**FIGURA 44**

**Figura 44. Las diferencias entre las densidades de las tres poblaciones de interneuronas no son homogéneas en los ejes dorsoventral y mediolateral del giro del núcleo caudado y del putamen postcomisural.** Gráficos de barras que ilustran la densidad de las interneuronas nitrérgicas, colinérgicas y calbindina positivas en la mitad dorsal (**A**) y ventral (**B**) del giro del núcleo caudado, y en el sector dorsolateral del putamen postcomisural (**C**). La relación entre la densidad de las tres poblaciones de interneuronas es heterogénea en el giro del núcleo caudado, ya que en su mitad dorsal la media de las interneuronas colinérgicas es muy similar a la de las calbindina positivas (**A**), y en la mitad ventral existe una mayor diferencia entre ambas (**B**). Sin embargo, no aparecen diferencias estadísticas entre estos tipos neuronales en ninguna de las dos mitades. En el sector dorsolateral del putamen postcomisural, la densidad de las interneuronas colinérgicas es similar a la de las calbindina positivas, sin encontrarse diferencias estadísticas entre ambas (**C**). \* indica diferencias estadísticamente significativas ( $0,05 > P > 0,01$ ), y \*\* muy significativas ( $P < 0,01$ ). **Abreviaciones:** *postcom.*, postcomisural.

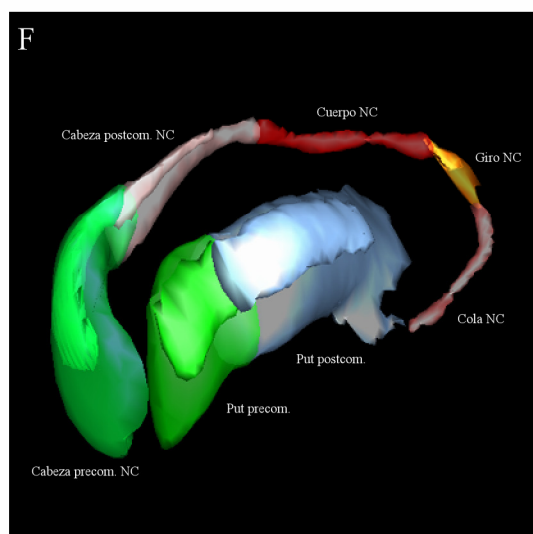
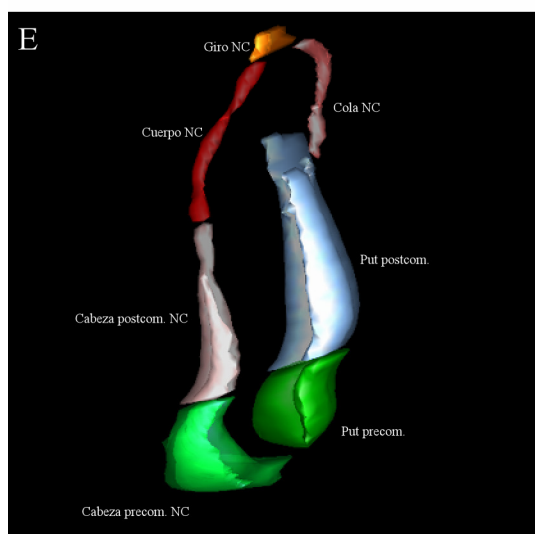
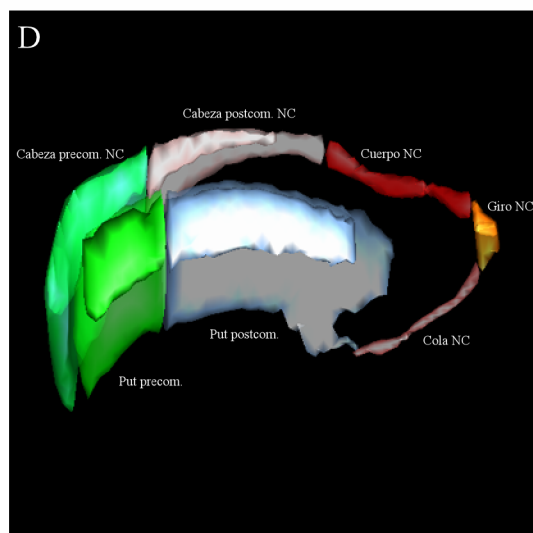
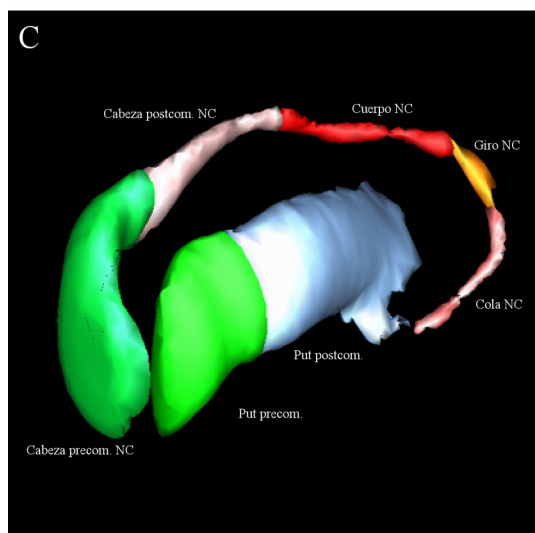
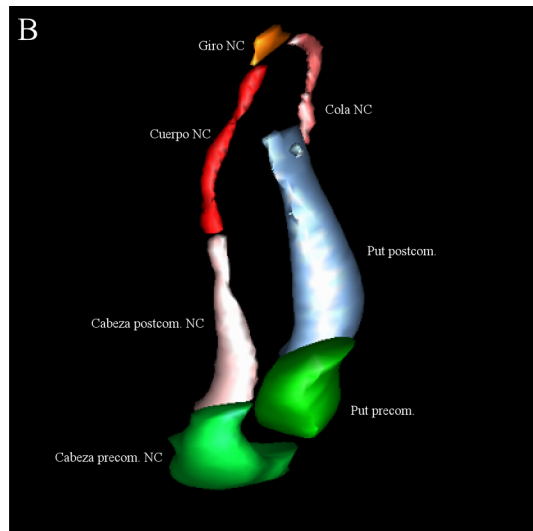
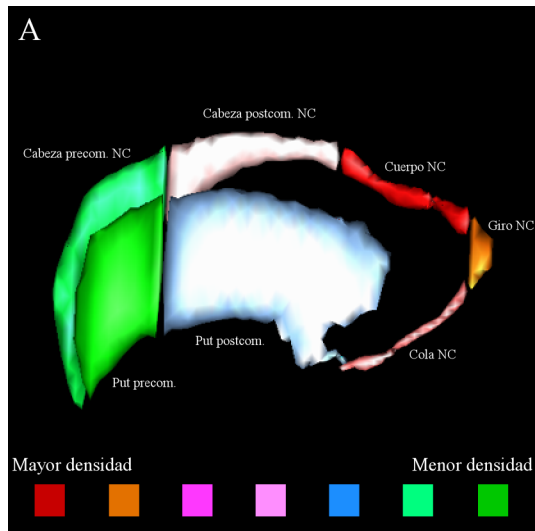




**FIGURA 45**

**Figura 45. La distribución de los tres tipos de interneuronas estriatales es heterogénea en el estriado humano.** Esquema tridimensional que pone de manifiesto las zonas del estriado en las que la cantidad de interneuronas es mayor. Para la elaboración de este esquema, se sumó la densidad de los tres grupos de interneuronas en las distintas regiones del estriado. Como indica el código de colores, el cuerpo del NC es la región estriatal con una mayor densidad interneuronal, seguido por el giro, la cola y la cabeza postcomisural de dicho núcleo. Las regiones del estriado con una menor densidad de interneuronas son el Put postcomisural, la cabeza precomisural del NC y, por último, el Put precomisural (**A-C**). En **D-F**, se muestran aquellos sectores, dentro de cada región estriatal, en los que la densidad interneuronal es significativamente mayor que en el resto de sectores de esa región. Como puede observarse, estos sectores son el cuadrante dorsomedial de la cabeza precomisural y postcomisural del NC, el cuadrante dorsolateral de las regiones precomisural y postcomisural del Put, y la mitad dorsal del giro del NC (**D-F**). **Abreviaciones:** *NC*, núcleo caudado; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *Put*, putamen.

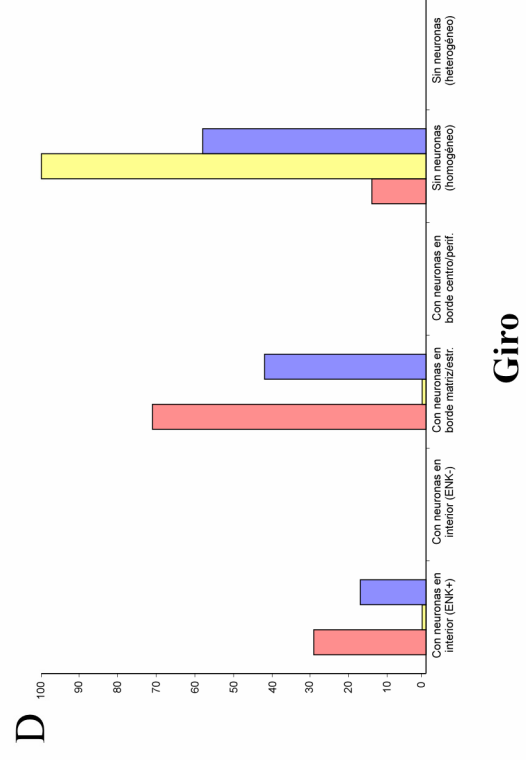
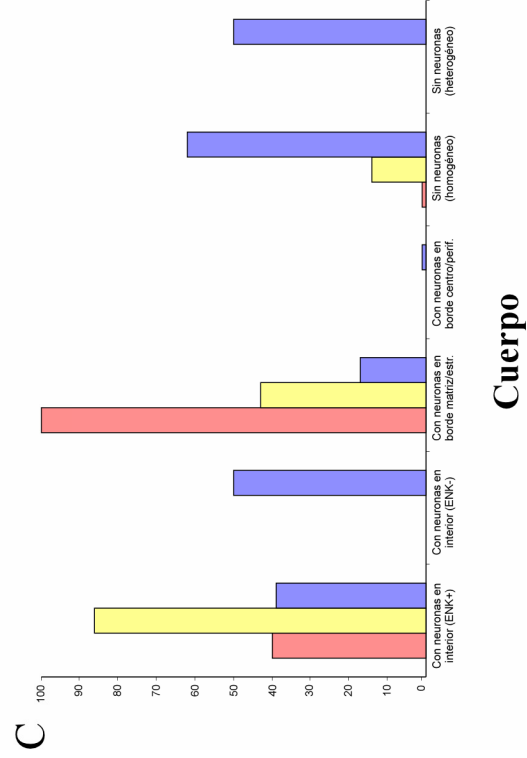
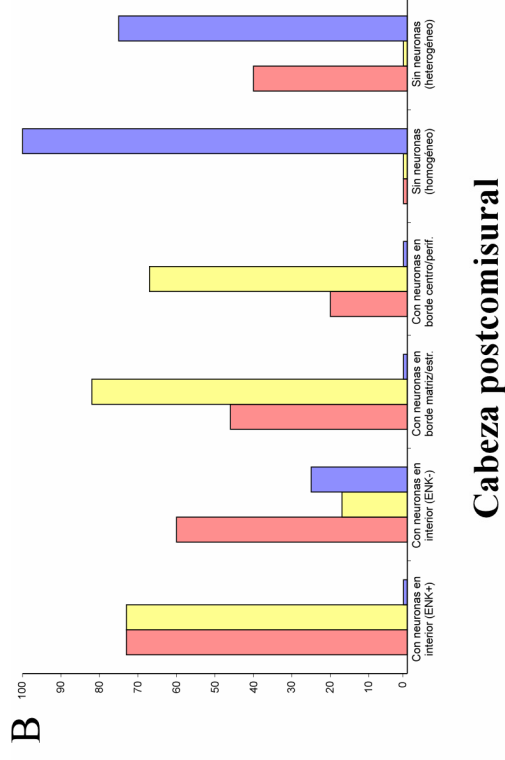
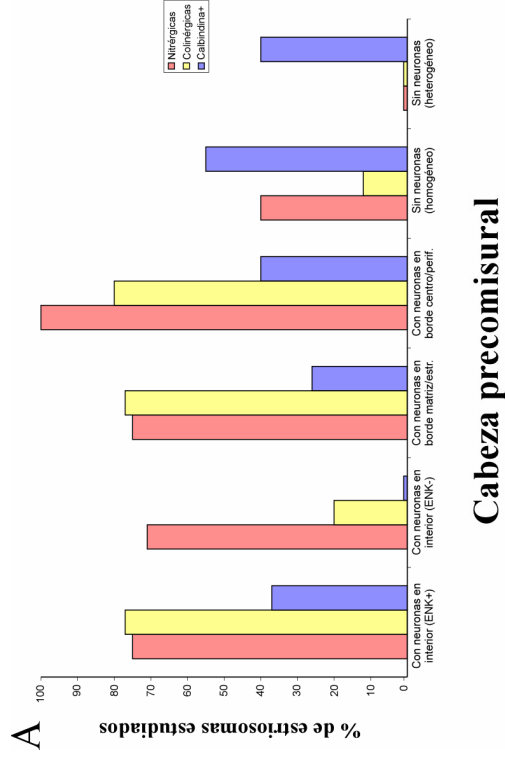






**FIGURA 46**

**Figura 46. Análisis cuantitativo de la organización compartimental de los tres tipos de interneuronas en las distintas regiones del núcleo caudado.** Gráficos de barras que ilustran la proporción de los estriosomas en relación con las interneuronas nitrérgicas, colinérgicas y calbindina positivas en la cabeza precomisural (**A**) y postcomisural (**B**), en el cuerpo (**C**) y en el giro (**D**) del núcleo caudado. En la cabeza precomisural, destaca la alta proporción de estriosomas con interneuronas nitrérgicas y colinérgicas en el interior y en los bordes entre los distintos compartimentos estriatales (matriz, centro y periferia), aunque la presencia de las interneuronas colinérgicas en el centro estriosomal es escasa (**A**). En la cabeza postcomisural, la presencia de interneuronas calbindina positivas en los estriosomas es muy pequeña; las interneuronas nitrérgicas parecen situarse en el interior de los estriosomas, mientras que las colinérgicas lo hacen en los bordes entre los distintos compartimentos (**B**). En el cuerpo, sin embargo, se da una situación bien distinta, ya que las interneuronas que aparecen en el interior de los “parches” son las colinérgicas y las calbindina positivas, mientras que las nitrérgicas tienden a localizarse en los bordes entre la matriz y los estriosomas (**C**). Por último, en el giro del núcleo caudado no aparecen estriosomas en relación con las interneuronas colinérgicas. La presencia de los otros dos grupos neuronales en el interior de los estriosomas es escasa, siendo mayor en los límites entre los dos compartimentos estriatales (**D**). **Abreviaciones:** *ENK*, encefalina; *estr.*, estriosoma; *perif.*, periferia.

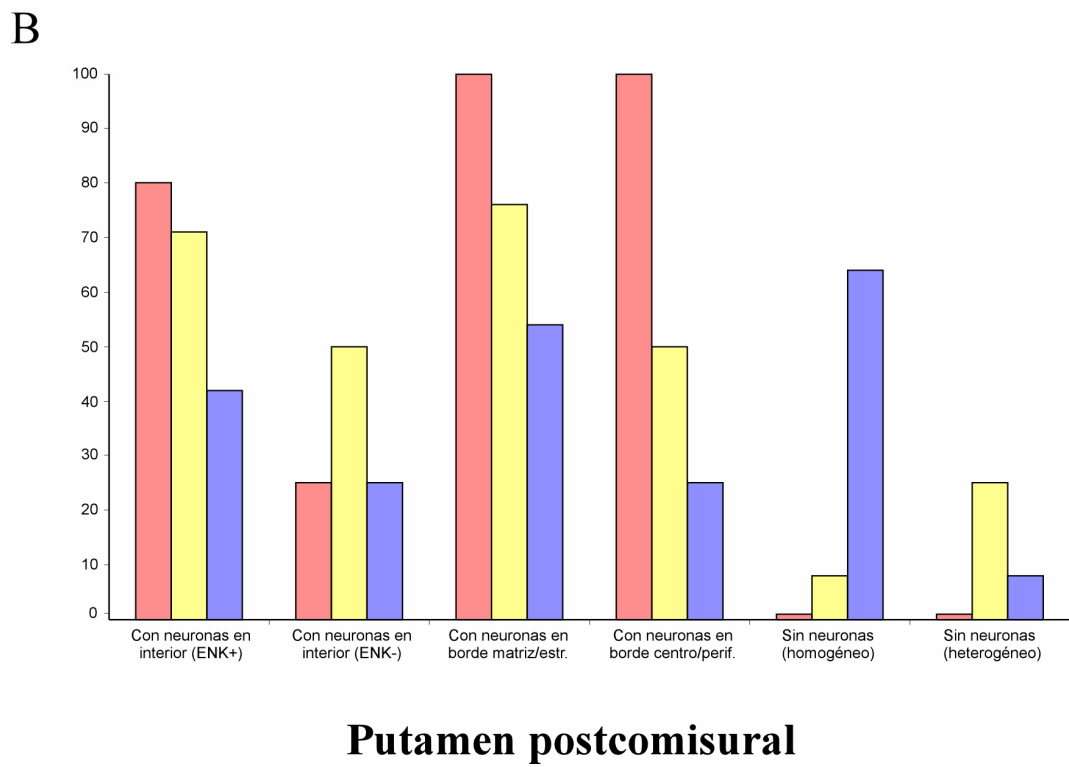
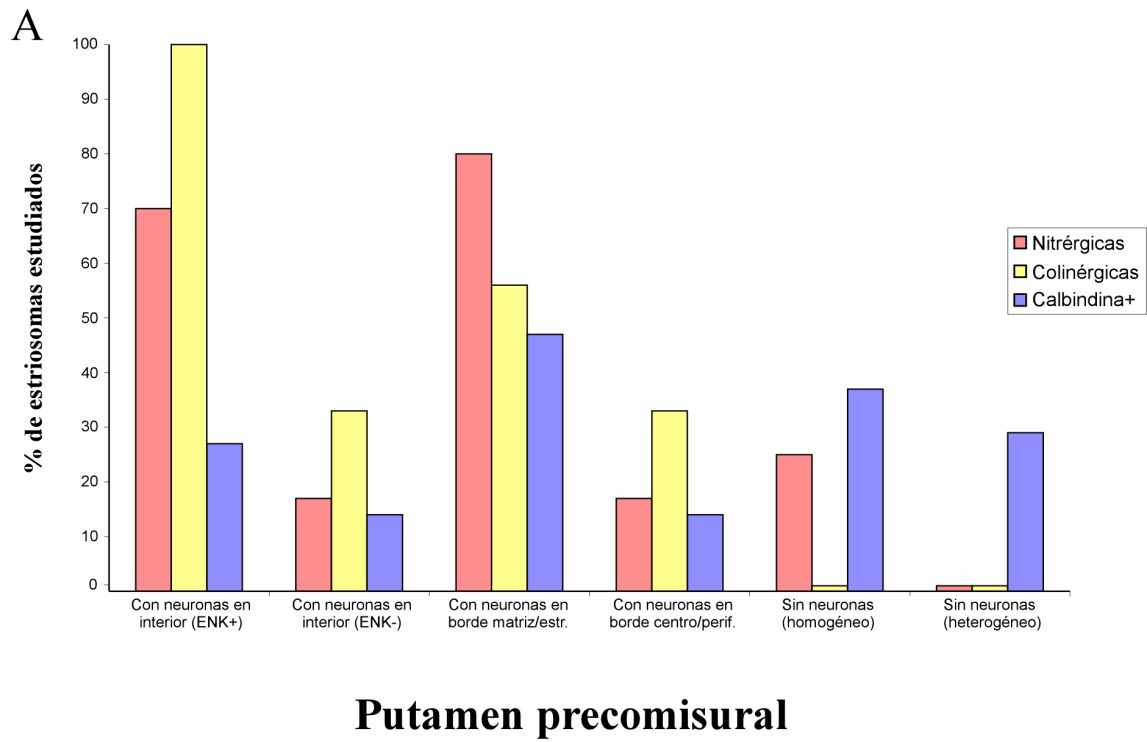




**FIGURA 47**

**Figura 47. Análisis cuantitativo de la organización compartimental de los tres tipos de interneuronas en las distintas regiones del putamen.** Gráficos de barras que ilustran la proporción de los estriosomas en relación con las interneuronas nitrérgicas, colinérgicas y calbindina positivas en el putamen precomisural (**A**) y postcomisural (**B**). En la región precomisural, los estriosomas con interneuronas colinérgicas en su interior y en el borde entre el centro y la periferia son más frecuentes que aquéllos que contienen los otros dos grupos de interneuronas; sin embargo, las interneuronas nitrérgicas aparecen en mayor medida en el borde entre la matriz y los estriosomas (**A**). En el putamen postcomisural, las interneuronas nitrérgicas son más abundantes tanto en el interior de los estriosomas homogéneos y en la periferia de los heterogéneos, como en los bordes entre la matriz y los estriosomas y entre el centro y la periferia; el centro estriosomal, sin embargo, es rico en neuronas colinérgicas (**B**). **Abreviaciones:** *ENK*, encefalina; *estr.*, estriosoma; *perif.*, periferia.

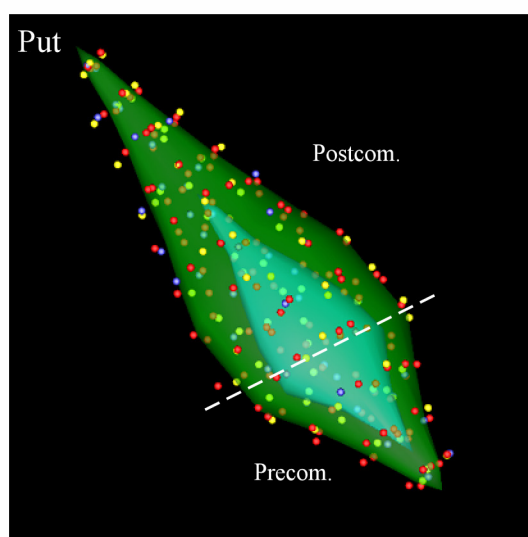
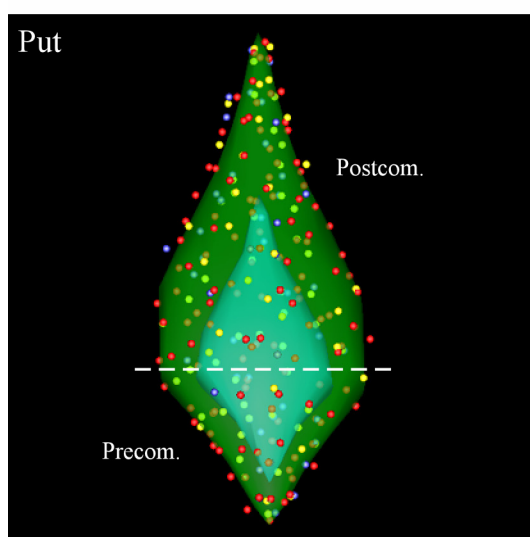
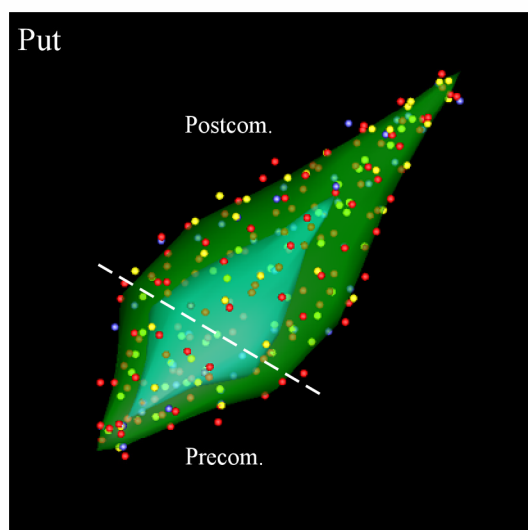
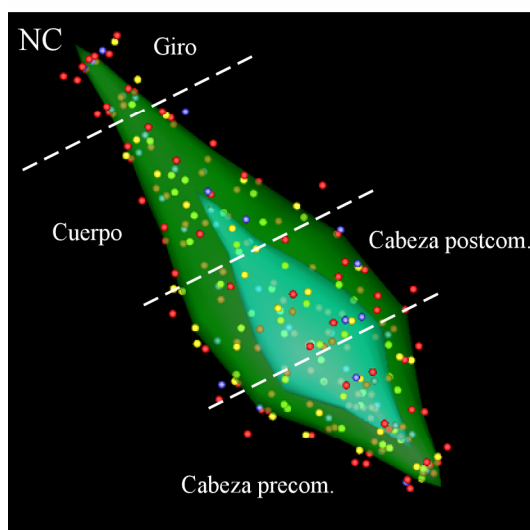
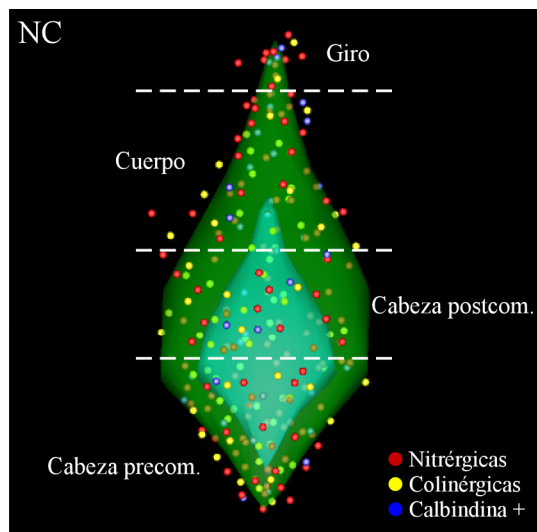
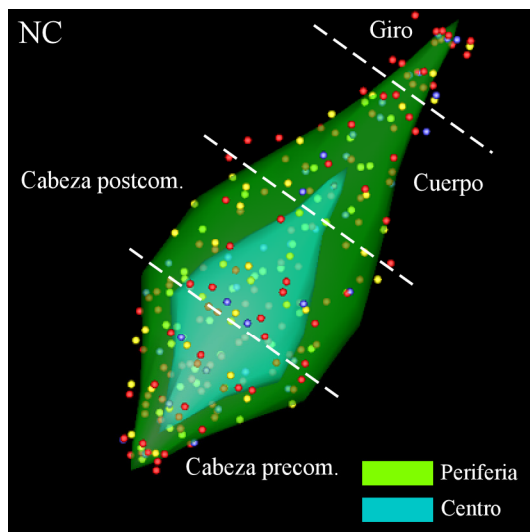






**FIGURA 48**

**Figura 48. La organización compartimental de los tres grupos de interneuronas es heterogénea a lo largo del eje anteroposterior del estriado.** Esquemas tridimensionales que ilustran la organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas, colinérgicas y calbindina positivas. Las tres primeras imágenes muestran diferentes vistas de un estriosoma esquemático situado en las distintas regiones del NC, mientras que las tres últimas se aplican a un estriosoma localizado en el Put. Aunque las interneuronas nitrérgicas son más abundantes que las colinérgicas en todas las regiones del estriado, el número de somas de las distintas poblaciones neuronales que aparecen en relación con el compartimento estriosomal en la cabeza del NC es similar. Las interneuronas nitrérgicas son más frecuentes en el centro estriosomal, mientras que las colinérgicas ocupan con mayor efectividad los bordes entre los distintos compartimentos. En la parte posterior del estriosoma, las interneuronas colinérgicas prácticamente no aparecen, dejando su lugar a las interneuronas nitrérgicas y calbindina positivas. En el Put la distribución de los tres grupos es bastante homogénea en el eje anteroposterior, aunque la presencia de las interneuronas nitrérgicas es mayor en los bordes entre los distintos compartimentos. La cantidad de interneuronas calbindina positivas es especialmente grande en el Put postcomisural, ocupando preferentemente el borde entre la matriz y los estriosomas. **Abreviaciones:** NC, núcleo caudado; *postcom.*, postcomisural; *precom.*, precomisural; *Put*, putamen.





## ***5. DISCUSIÓN***





### **5.1. Consideraciones metodológicas**

#### *5.1.1. División del estriado*

La división del estriado humano llevada a cabo en el presente trabajo tuvo como objetivo alcanzar una mayor profundidad en el análisis de la heterogeneidad estriatal. La hipótesis de partida de este estudio era la distribución desigual de las interneuronas a lo largo de toda la extensión anteroposterior, dorsoventral y mediolateral del estriado humano, para lo cual se necesitaba una división estandarizada y reproducible del núcleo caudado y del putamen en esos tres ejes. El empleo de la comisura anterior para dividir el estriado en precomisural y postcomisural es muy frecuente en el estudio anatómico del estriado. Además, la naturaleza de las proyecciones corticoestriatales en estos dos territorios parece ser distinta, sobre todo en el putamen (Parent, 1990), lo cual podría indicar que estos territorios son heterogéneos no sólo a nivel hodológico sino también celular.

El punto en el cual la cabeza del núcleo caudado se convierte en el cuerpo no está bien definido, ya que no hay ningún componente estriatal o extraestriatal que marque el fin de la una y el comienzo del otro. Por ello, se emplean distintos puntos de referencia convencionales que se sitúan en torno al estrechamiento que sufre el núcleo caudado en su discurrir anteroposterior. Esta pérdida de diámetro se aprecia también en el ventrículo lateral, que acompaña a esta estructura estriatal en toda su extensión. En la Nomenclatura Anatómica Ilustrada de Feneis y Dauber (2003), se considera que el cuerpo del núcleo caudado es aquella porción que se sitúa por encima del tálamo mientras que, en otros textos y manuales, el punto en el que empieza esta región estriatal es aquél en el que aparece el orificio interventricular (Haines, 2003). En nuestra opinión, esta última referencia es difícil de apreciar en cortes coronales del estriado humano. Con respecto a la primera, preferíamos un punto de referencia más concreto, ya que no se aprecia apenas ninguna diferencia anatómica macroscópica en el núcleo caudado tras el comienzo del tálamo. Una vez que desaparecen los cuerpos mamilares hipotalámicos, sin embargo, se aprecia un claro estrechamiento del núcleo caudado.

El giro del núcleo caudado es una región que aún no había sido definida con claridad en la literatura. Nosotros la diferenciábamos por necesidad, ya que era una región que no podía ser considerada ni cuerpo ni cola del núcleo caudado. Una vez realizado el

estudio de la anatomía química del estriado posterior y de las interneuronas estriatales, esta región resultó tener unas características distintas a las de las zonas estriatales que la flanqueaban. Con respecto a la cola del núcleo caudado, el principal problema se encontró a la hora de diferenciarlo del putamen posteroventral. Esta dificultad es frecuente en los trabajos anatómicos del estriado posterior (Fudge y Haber, 2002). Después de seguir corte a corte el desarrollo del putamen ventral, se observó que la cola del núcleo caudado aparecía en una localización más lateral que éste, y que, a niveles más posteriores, se unían poco antes de la desaparición definitiva del putamen posteroventral.

El núcleo *accumbens* fue descartado en este estudio debido a la complejidad de su anatomía química, que le hace distinto del estriado dorsal (Prensa y cols., 2003). En vez de estar formado por la matriz y los estriosomas, en el núcleo *accumbens* cabe distinguir otros dos compartimentos, que habitualmente conservan la nomenclatura inglesa: *shell* y *core* (Heimer y cols., 1991; Prensa y cols., 2003). En un futuro, puede resultar interesante repetir este mismo estudio en el núcleo *accumbens*, aunque considerábamos oportuno abordarlo de un modo independiente al presente trabajo. Como se ha descrito en el apartado **Material y Métodos**, el núcleo *accumbens* fue delimitado siguiendo la convención propuesta por Selden y colaboradores (1994b). Según estos autores, en primer lugar se traza una línea en dirección dorsoventral en el centro de la cápsula interna. De esta manera, se separan el núcleo caudado y el putamen. A continuación, se dibuja una línea perpendicular a la primera que pase por el polo inferior de la cápsula interna. Este sistema para delimitar la situación del núcleo *accumbens* ha sido también utilizado por otros autores (Holt y cols., 2005).

La parcelación del estriado en los ejes dorsoventral y mediolateral se llevó a cabo dividiéndolo equitativamente en sus mitades correspondientes. Este hecho también supone la estandarización de un criterio que hasta el momento había estado poco definido. Con respecto a la segmentación del estriado en sus porciones dorsales y ventrales, es digno de mención que lo que en este trabajo se denomina como mitad ventral del estriado, no corresponde exactamente a lo que en la literatura se conoce como estriado ventral. A este respecto, existe una cierta controversia acerca de si éste incluye únicamente el núcleo *accumbens* y las agrupaciones de células que lo rodean (también conocidas como *insulae terminalis*) (Sanides, 1957), o si conviene incluir en esta denominación otras regiones próximas con características hodológicas muy

similares, como son la parte ventral del núcleo caudado y del putamen (Haber y cols., 1990; Heimer y cols., 1999). Por ello, en este trabajo se optó por un criterio exclusivamente topográfico para dividir al estriado en cuatro sectores de tamaño similar, independientemente de su conectividad. De esta manera, se trató de evitar controversias y aportar unos datos fácilmente comprensibles e interpretables desde el punto de vista topográfico.

### *5.1.2. Material humano y técnicas de marcaje empleadas*

En el presente trabajo se analizaron nueve cerebros procedentes de individuos sin alteraciones neurológicas o psiquiátricas (Tabla 1) y, además, otros cerebros no incluidos en la tabla citada fueron empleados para confirmar algunos de los hallazgos acerca de la anatomía química estriatal. Estos casos no han sido incluidos en la tabla al haberse empleado sólo de forma esporádica. Debido a la dificultad para conseguir un material humano de calidad, el presente número de casos se consideró suficiente para obtener unos datos fiables y reducir el efecto de las variaciones interindividuales. De hecho, los trabajos llevados a cabo en los últimos tiempos para estudiar distintos aspectos de la anatomía química de los ganglios basales, presentan un número de casos similar (Selden y cols., 1994b; Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1999; Wu y Parent, 2000; Prensa y cols., 2003; Roberts y cols., 2005a; b).

En cuanto al tamaño de la muestra para llevar a cabo el análisis estadístico, el número de datos obtenidos en las distintas regiones parece ser suficiente para realizar el análisis descriptivo y la comparación entre las muestras. En el caso de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas, el valor medio del número de datos en cada región fue 60, mientras que en las interneuronas calbindina positivas, debido a que la fracción de muestreo de los cortes fue inferior, se obtuvieron una media de 30. Este cambio en la fracción de muestreo de los cortes fue compensada con un aumento en la fracción del disector óptico por lo que, aunque disminuyó el número de datos, su distribución fue más homogénea. Los factores extrínsecos que afectan con más frecuencia a los niveles de neurotransmisores y sustancias relacionadas en el cerebro humano son el tiempo post mórtem, y la temperatura a la cual se recoge y se fija el material (Hornykiewicz, 2001). En el presente estudio, salvo los casos 3 y 6 de la Tabla 1, los cerebros fueron sumergidos en el fijador con un tiempo post mórtem óptimo, y fueron inmediatamente situados a 4 °C. La calidad del material quedó patente al llevar a cabo las técnicas

histoquímicas e inmunohistoquímicas, y observar iguales resultados a los obtenidos en los trabajos ya publicados. Con respecto a la edad y al sexo de los individuos, habría sido deseable contar con una mayor variedad para observar la influencia de estos dos factores sobre los parámetros estudiados. Sin embargo, como se ha dicho antes, la dificultad para conseguir un material humano de alta calidad hace que el control de estos factores sea muy difícil.

Las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas desarrolladas en este trabajo han sido validadas en gran cantidad de estudios previos (Geneser-Jensen y Blackstad, 1971; Graybiel y Ragsdale, 1978; Scherer-Singler y cols., 1983; Mesulam y cols., 1984; Ferrante y cols., 1987; Kawaguchi y cols., 1995; Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1998; Holt y cols., 1999; Prensa y cols., 1999; Cicchetti y cols., 2000). Como se ha mencionado en el apartado **Material y Métodos**, la principal diferencia entre ambas técnicas radica en que la primera detecta la actividad de una enzima, mientras que la segunda detecta su presencia (Figura 2). Por ello, las técnicas histoquímicas requieren un control más exigente de los factores que puedan afectar a la integridad de las proteínas del tejido, y que puedan así seguir siendo funcionales. La efectividad con la que las técnicas histoquímicas de la acetilcolinesterasa y de la NADPH-diaforasa se llevaron a cabo en este trabajo pone de manifiesto la calidad del material humano empleado. El tiempo de incubación en ambos procedimientos varió de unos cerebros a otros, aunque siempre en intervalos de tiempo razonables con respecto a los protocolos encontrados en la literatura.

El tiempo de incubación y la concentración de los anticuerpos primarios variaron de un modo considerable en las distintas técnicas inmunohistoquímicas, mientras que el resto de pasos se mantuvieron constantes. La cantidad de proteína presente en el tejido estriatal no debería ser considerada la única causa de estas diferencias, sino que además podrían ser debidas a la afinidad del anticuerpo primario al unirse a su diana, a la efectividad del revelado, o a la temperatura a la cual se han llevado a cabo las diferentes incubaciones. Por ello, las técnicas inmunohistoquímicas no pueden ser consideradas cuantitativas a la hora de comparar secciones distintas. Lo adecuado en este caso es observar las diferencias de marcaje dentro de la misma preparación, y comparar esas diferencias en lugar del marcaje en sí.

### *5.1.3. Estereología e interpretación estadística de los resultados*

El estudio de la distribución de las interneuronas estriatales se intentó llevar a cabo mediante la observación y el correspondiente dibujo de su presencia en un corte coronal por cada región del estriado. Sin embargo, se observó que su distribución podía cambiar de un modo considerable en cortes adyacentes, y que hacía falta un método más completo que tuviera en cuenta un mayor número de cortes y aportara datos fiables sobre la presencia de las neuronas en el volumen total de la región estriatal estudiada. Por ello, se recurrió a las técnicas estereológicas.

El desarrollo de la metodología estereológica sufrió un gran avance a partir de 1984, año en el que fueron publicados importantes trabajos en diversos campos con esta metodología (Boysen y Reith, 1984; Mayhew y Sharma, 1984a; b; Reith y Boysen, 1984; Sterio, 1984). Desde ese momento y hasta ahora, el empleo de la estereología se ha vuelto casi imprescindible en los estudios anatómicos cuantitativos. Así, se pretende alcanzar un conocimiento tridimensional a partir de datos bidimensionales, como pueden ser los distintos planos focales de una preparación al ser vista en el microscopio. Sin embargo, hoy en día siguen existiendo trabajos que expresan el número de neuronas por unidad de área, lo cual implica, a nuestro entender, un error de concepto: si se están cuantificando estructuras tridimensionales, lo correcto será relacionarlo con unidades tridimensionales, esto es, de volumen.

También hay que tener en cuenta que el empleo de técnicas estereológicas como el disector o el fraccionador óptico sobre cortes procesados histoquímica o inmunohistoquímicamente pueden dar lugar a otro tipo de problemas, tales como el encogimiento del tejido producido por su deshidratación, congelación o aplastamiento al ser cubierto. Para resolver estos problemas, existen una serie de factores de corrección que suelen aplicarse cuando el objetivo final es conocer el número absoluto de partículas presentes en una determinada región (Avendaño y cols., 2005b). Como el propósito del presente estudio era conocer el número relativo, es decir, la densidad celular de los distintos tipos de neuronas en el estriado humano, no se consideró necesario aplicar ningún factor de corrección a los datos obtenidos. Todas las secciones de tejido empleadas en estos experimentos sufrieron un procesamiento similar, por lo que, si existe algún factor que pueda alterar la densidad neuronal por un cambio en el volumen del tejido, será el mismo en todos los cortes. Este trabajo muestra aquellas zonas del estriado que contienen una mayor densidad celular de tres grupos de

interneuronas. Por lo tanto, su objetivo primordial no es proporcionar el número exacto de neuronas por unidad de volumen en cada región, sino las diferencias que existen entre ellas en cuanto a su densidad. Aunque estos números puedan verse afectados por alteraciones del volumen del tejido, las diferencias entre las regiones y entre las tres poblaciones de interneuronas seguirán siendo las mismas.

Con respecto a la presentación de los datos obtenidos, se optó por ofrecer el error estándar de la media por ser el mejor indicador de la variación de ésta. Muchos trabajos indican la desviación típica; sin embargo, es necesario reseñar que estos dos parámetros estadísticos tienen significados distintos. La desviación típica de la muestra indica cuánto se alejan los datos del valor de referencia de esa muestra, es decir, de la media. Sin embargo, el error estándar de la media expresa la efectividad de ésta, cuánto puede acercarse al valor real. Depende del número de casos medidos en la muestra, ya que su expresión numérica es el cociente entre la desviación típica y la raíz cuadrada del tamaño muestral.

En ocasiones, se piensa erróneamente que los trabajos que indican la media y su error estándar lo hacen para enmascarar una gran variación de los datos, ya que, como se deduce de la expresión matemática citada anteriormente, el error estándar siempre es más pequeño que la desviación típica. Sin embargo, existe un significado científico en este modo de expresión. A través del error estándar se puede deducir entre qué valores tendremos una alta probabilidad de encontrar la media de nuestros datos si volvemos a repetir el experimento. Así, está relacionado con la reproducción de un experimento científico.

La expresión de la media acompañada de la desviación típica describe perfectamente las características de nuestra población de datos, mientras que el error estándar indica la calidad de la media que hemos obtenido. El inconveniente que existe al dar el error estándar de la media es que no se trata de un valor directamente aplicable a los datos de una muestra hasta que no se le multiplica por el valor asociado a una probabilidad (*t*). De modo explicativo, este valor indicará que, al repetir el experimento, la probabilidad de encontrar la nueva media en un determinado intervalo será del 95%, 99%, o la que se escoja en cada caso. Por ejemplo, siendo  $9671 \pm 312 \mu\text{m}^3$  (media  $\pm$  error estándar de la media) el volumen del soma de las interneuronas colinérgicas en el putamen precomisural, y sabiendo que los grados de libertad de la población (número

de datos menos uno) es 280, el intervalo en el cual podemos encontrar el volumen medio de estas neuronas con un 95% de probabilidad en caso de repetir el experimento es (9057, 10286)  $\mu\text{m}^3$ .

Las pruebas estadísticas empleadas en este trabajo son las habituales a la hora de comparar dos o más muestras. Todos los análisis de significación están basados en la probabilidad de que un determinado valor sea igual a otro. Por ello, el significado de que la probabilidad asociada a una prueba estadística revele diferencias significativas o muy significativas entre dos muestras, indica cómo de pequeña es la probabilidad de que, en futuras medidas, esas medias alcancen el mismo valor. El que la probabilidad asociada a una prueba *ANOVA* sea 0,035 cuando se comparan los cuatro cuadrantes de una región significa que existe una probabilidad del 3,5% de que en futuros estudios las medias de los cuatro cuadrantes coincidan. Por convención, una probabilidad inferior al 5% es entendida como una diferencia significativa entre las medias de las distintas poblaciones. Ésta es la razón por la cual el resultado de las pruebas estadísticas no siempre es proporcional a la diferencia observada entre las medias de distintas muestras.

La dispersión de los datos puede hacer que cambie la probabilidad asociada a una prueba estadística. Por ejemplo, la diferencia de la densidad de las interneuronas colinérgicas entre la cabeza precomisural y la cola del núcleo caudado es 132, mientras que entre la cabeza precomisural del núcleo caudado y el putamen postcomisural es sólo 91. Sin embargo, la probabilidad asociada a la prueba de *Tamhane* en el primero de los casos es 1,000, y en el segundo es 0,001. Esto es debido a que la dispersión de los datos de la cola del núcleo caudado es mucho mayor que los del putamen postcomisural, por lo que la prueba afirma que existe una alta probabilidad de que la media de la cola del núcleo caudado acabe coincidiendo con la de la cabeza precomisural, aunque a simple vista ambas sean muy distintas. Por el contrario, la distribución de los datos de la cabeza precomisural del núcleo caudado y del putamen postcomisural es bastante homogénea, y la prueba puede asegurar que la probabilidad de que ambas medias coincidan es sólo del 0,1%.

## 5.2. Anatomía química del estriado posterior

Los resultados del presente estudio demuestran por primera vez la compleja anatomía química del estriado posterior. Algunas de las características encontradas coinciden con los datos descritos en la porción anterior del estriado humano, aunque

también se han visto otras características que ponen en evidencia un mayor grado de compartimentación química en el tercio posterior del núcleo caudado y del putamen.

En primer lugar, se ha demostrado la presencia de estriosomas en la porción posterior del cuerpo y en el giro del núcleo caudado, así como en el polo posterior del putamen. Sus características químicas coinciden a grandes rasgos con las de los estriosomas encontrados en niveles anteriores (Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1999). La principal diferencia entre las regiones anteriores y posteriores radica en que en éstas últimas los estriosomas son de menor tamaño y la heterogeneidad estriosomal es menor, ya que prácticamente desaparece en los niveles más posteriores (Prensa y cols., 1999; Bernácer y cols., 2005). En términos generales, podría decirse que la heterogeneidad estriosomal es directamente proporcional al tamaño del estriosoma. Cuanto más pequeño sea, más homogéneo parece ser. Sin embargo, no se puede descartar que los pequeños “parches” homogéneos que se observan en el estriado posterior sean la parte final de grandes estriosomas que se han formado en niveles más anteriores.

Según nuestras propias observaciones, no ilustradas en este trabajo, en la porción más anterior del estriado todos los estriosomas parecen ser homogéneos. De esta manera, los estriosomas podrían ser vistos tridimensionalmente como un complejo sistema de túneles cuyas gruesas paredes presentan una composición química distinta con respecto a la zona central, y con dos extremos, tanto el anterior como el posterior, de gran grosor. Así, los estriosomas homogéneos que se observan en el estriado anterior podrían ser los extremos de las pequeñas ramificaciones que surgen de estriosomas más grandes, y que cruzan toda la extensión anteroposterior del estriado. Siguiendo con este razonamiento, estos estriosomas terminarían en el cuerpo y en el giro del núcleo caudado, deduciendo esto de dos observaciones: la primera, que no hemos encontrado ningún estriosoma en la cola del núcleo caudado; la segunda, que si los estriosomas siguieran el curso del giro del núcleo caudado, sería esperable encontrar en esta región grandes estriosomas cortados en sentido longitudinal, y esto no ha sido así en ninguna sección del material experimental analizado en nuestro estudio.

Las implicaciones funcionales que puede conllevar la ausencia de estriosomas en la cola del núcleo caudado son hasta el momento desconocidas. Esta región ha sido vinculada con procesos auditivos, visuales y otros relacionados con el aprendizaje (Rolls, 1994; Yeterian y Pandya, 1998; Fernandez-Ruiz y cols., 2001; Seger y Cincotta, 2005; de la Mothe y cols., 2006). Sin embargo, muchas de estas funciones son



compartidas por otras regiones del estriado donde se han encontrado estriosomas, como el cuerpo del núcleo caudado. En este sentido, es interesante destacar que una región del putamen topográficamente ligada a la cola del núcleo caudado, como es el putamen posteroventral, participa en funciones similares a las de la cola del citado núcleo estriatal (Rolls, 1994; Yeterian y Pandya, 1998). En esta región del putamen tampoco se encontraron estriosomas. Una interpretación de la ausencia de estriosomas en estos dos territorios estriatales es su posible conexión directa con estructuras límbicas (Haber, 2003; Haber y Johnson, 2004). Las regiones ventrales del estriado, entre las que se encuentra la cola del núcleo caudado, son diana frecuente de proyecciones procedentes del complejo amigdalino, la formación del hipocampo, y otras regiones límbicas corticales (Parent, 1990; Selden y cols., 1994a; Haber, 2003; Haber y Johnson, 2004). Así, podría concluirse que la labor de los estriosomas como agrupaciones de proyecciones de naturaleza límbica en la cola del núcleo caudado no es necesaria, ya que recibe estas proyecciones directamente en la mayoría de su superficie.

La gran diferencia que caracteriza a los estriosomas de la porción posterior del estriado con respecto a los de las regiones más anteriores es su tinción con el marcador dopaminérgico de la tirosina hidroxilasa. Esta enzima es determinante en la síntesis de las catecolaminas (Nagatsu y Stjarne, 1998) y, si bien puede marcar algunas fibras noradrenérgicas, al menos detecta todas las dopaminérgicas, hecho que no ocurre con otros marcadores como la proteína transportadora de dopamina (Melchitzky y Lewis, 2001). En el estriado, la tirosina hidroxilasa marca fundamentalmente el neuropilo que procede de las terminales nigroestriatales, ya que las interneuronas dopaminérgicas parecen ser muy poco numerosas en el estriado humano (Prensa y cols., 2000; Cossette y cols., 2005). Como se ha descrito en el apartado correspondiente, los estriosomas del estriado posterior parecían estar rodeados de un fino anillo de neuropilo carente de tirosina hidroxilasa. Este anillo, que no había sido descrito previamente, se asemeja al área “estriocapsular” que rodea a los estriosomas pobres en calbindina en el macaco, y que se caracteriza por tener cuerpos neuronales ricos en el receptor de sustancia P, y neuropilo inmunorreactivo frente a esta proteína (Jakab y cols., 1996). Según comprobaron los citados autores, las neuronas situadas en esta área que circundaba al estriosoma expresaban también marcadores propios de las interneuronas colinérgicas y nitrérgicas, hallazgo que no sorprende tras observar los resultados del presente trabajo. Estas dos poblaciones de interneuronas cuentan con receptores dopaminérgicos de los

tipos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (Kerkerian y cols., 1986; Rivera y cols., 2002; Saka y cols., 2002; Chiken y cols., 2003). Así pues, conjugando los resultados de Jakab y colaboradores (1996) con los nuestros presentados aquí, se puede concluir que las interneuronas colinérgicas y nitrérgicas situadas alrededor de los estriosomas en la porción posterior del estriado pueden estar sujetas en menor medida al control de la dopamina que procede de las terminales nigroestriatales.

Otro aspecto novedoso que aporta nuestro estudio es la descripción de una banda rica en encefalina y proteína de membrana asociada al sistema límbico en el límite lateral del putamen, y dorsolateral del núcleo caudado. Además, este fino borde de tejido es pobre en acetilcolinesterasa y parvalbúmina, con lo cual se observan en él las mismas características que en el compartimento estriosomal (Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1999). De los presentes resultados puede interpretarse que esta fina banda de tejido estriatal pertenece al compartimento estriosomal y que, como tal, podría compartir también sus características hodológicas. Otra posible interpretación sería concebir este hallazgo como un nuevo compartimento estriatal, presente sólo en el estriado posterior. Sea cual fuere el punto de vista que se tome, el presente trabajo demuestra que la porción posterior del estriado humano está envuelta por una fina capa de tejido con características químicas similares a las de los estriosomas.

En un estudio reciente, Lévesque y colaboradores (2004) demuestran que la zona dorsolateral del núcleo caudado y del putamen del primate no humano presenta, como los estriosomas, unos niveles altos de la enzima ácido glutámico descarboxilasa, responsable de la síntesis del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). En primer lugar, esto indicaría que en el interior de los estriosomas la síntesis de GABA sería más activa que en la matriz. Además, teniendo en cuenta que el GABA estriatal se segrega junto con los neuropéptidos encefalina, sustancia P o dinorfina, y que todos ellos son abundantes en los estriosomas (Sugimoto y Mizuno, 1987; Besson y cols., 1990; Hurd y Herkenham, 1995; Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1999), no sorprende la abundancia de marcadores gabaérgicos en el compartimento estriosomal.

Con respecto al marcaje de la zona dorsolateral del núcleo caudado y del putamen, Lévesque y colaboradores (2004) reconocen la semejanza de esta zona con la banda subcallosa de los roedores, a la que ya se le habían atribuido características químicas similares a las del compartimento estriosomal (Goodman y Pasternak, 1985;

Murrin y Zeng, 1989; Tokuno y cols., 1996). Es interesante señalar cómo en el estudio realizado con la técnica del trazado axónico unitario en la rata, Prensa y Parent (2001) demostraron que al menos una colateral de todos los axones nigroestriatales alcanzaba esta banda subcallosa, independientemente de su origen en la zona dorsal o ventral de la sustancia negra compacta y de su diana en el compartimento matricial o estriosomal del estriado. Esto atribuiría a la banda subcallosa un papel integrador de los distintos tipos de proyecciones dopaminérgicas nigroestriatales (Lévesque y cols., 2004) y, según lo aportado por nuestros resultados, estaría también influido por el neuropéptido encefalina y por proyecciones de naturaleza límbica.

Por último, nuestro trabajo acerca de la anatomía química del estriado posterior describe por primera vez la presencia de gradientes de intensidad en distintas zonas del núcleo caudado humano, cuando éstas fueron teñidas con acetilcolinesterasa y parvalbúmina. En el caso del cuerpo y del giro del núcleo caudado, el marcaje del neuropilo aumentó desde la zona dorsomedial hasta la ventrolateral, mientras que en la cola de este núcleo estriatal el sentido era inverso. Burke y Karanas (1990) demostraron en ratas la presencia de un gradiente creciente del neuropilo colinérgico desde las zonas mediales del estriado hasta las laterales. Estos autores comprobaron la influencia de las interneuronas colinérgicas en la generación de este gradiente, pero observaron que su distribución, prácticamente homogénea, no se ajustaba a él. Por lo tanto, propusieron que estas diferencias de marcaje deberían ser generadas por una innervación colinérgica externa al estriado.

En diversos trabajos, se ha afirmado que el neuropilo colinérgico del estriado parece proceder de las interneuronas colinérgicas y, en menor medida, de proyecciones aferentes desde el núcleo tegmental pedunculopontino, e incluso de los axones nigroestriatales (Levey y cols., 1983; Woolf y Butcher, 1986; Woolf, 1991). En nuestro estudio, no hemos podido encontrar diferencias en la distribución de las interneuronas colinérgicas en el eje mediolateral en las porciones posteriores del estriado, debido al pequeño tamaño del núcleo caudado en estas zonas. Sin embargo, si suponemos que la densidad de estas neuronas es similar a la de la cabeza postcomisural del núcleo caudado, observamos que el sector dorsomedial contiene una densidad de neuronas colinérgicas mucho mayor que el sector ventrolateral. Estos hallazgos no pudieron ser confirmados en su totalidad a la vista de los resultados de este estudio, donde no queda demostrado si las interneuronas colinérgicas se distribuyen heterogéneamente en el

cuerpo y en la cola del núcleo caudado. En el caso del giro del núcleo caudado, la densidad neuronal en la porción ventral con respecto a la dorsal era sensiblemente mayor, correspondiendo en este caso con la distribución del neuropilo colinérgico.

En el caso de la parvalbúmina, el neuropilo del estriado de la rata parece proceder de los axones y terminales de las propias interneuronas estriatales (Kita y cols., 1990). Por el contrario, en los primates no humanos se ha comprobado que este neuropilo es debido a las proyecciones talamoestriadas (Lapper y Bolam, 1992; Sadikot y cols., 1992), y que no parece proceder de las interneuronas estriatales (Smith y Bolam, 1990). Concretamente, la fuente de estas proyecciones aferentes del estriado parece ser los núcleos intralaminares caudales, donde las neuronas de proyección contienen principalmente parvalbúmina (Jones y Hendry, 1989), y se dirigen a la matriz [(Sadikot y cols., 1992); véanse los comentarios de Prensa (1998) con respecto a este tema]. Teniendo en cuenta estos datos, el gradiente encontrado en nuestro estudio implicaría una heterogénea inervación de la matriz del estriado posterior por parte del tálamo, añadiendo un nuevo nivel de complejidad a la organización de las conexiones aferentes del estriado humano.

En definitiva, la primera parte de este trabajo aporta datos novedosos sobre la anatomía química del estriado posterior. Si bien estas regiones parecen tener una organización más simple en cuanto a la estructura de los estriosomas, en ellas aparecen nuevas características químicas no encontradas en el estriado anterior, como son la aparición de gradientes y un llamativo marcaje en la zona lateral del putamen y dorsolateral del núcleo caudado. Como en el estriado se ha demostrado que la heterogeneidad química está vinculada a una mayor diversidad funcional, el presente trabajo puede ayudar a clarificar la organización de la información en las regiones posteriores del estriado, habitualmente obviadas en muchos de los estudios realizados hasta ahora.

### **5.3. *Interneuronas estriatales nitrérgicas***

El presente estudio constituye el primer análisis en profundidad de las interneuronas nitrérgicas en toda la extensión del estriado humano. Hasta el momento, ningún trabajo había descrito la presencia de estas neuronas en regiones tan posteriores como el giro del núcleo caudado, que curiosamente resultó ser la zona más densamente poblada. De nuestros resultados se deduce que la distribución de las interneuronas

nitrérgicas en el estriado es heterogénea, tanto en los ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral, como con respecto al compartimento estriosomal.

La primera parte del estudio de esta población de interneuronas consistió en su caracterización morfológica. Nuestro propósito era clasificar estas neuronas en distintos grupos morfológicos para después poder comprobar si existían variaciones en la distribución o en la organización compartimental de las distintas morfologías descritas. Hasta el momento, dos grupos de investigadores habían clasificado estas neuronas en el estriado humano en función de su morfología (Kowall y cols., 1987; Johannes y cols., 2003). Sin embargo, ninguno de ellos lo había hecho en toda la extensión del estriado. El primero de los trabajos describe las características morfológicas de las neuronas reveladas con la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa, y con las inmunohistoquímicas para la detección del neuropéptido Y y de la somatostatina. Los autores identificaron a una población de neuronas estriatales no espinosas de tamaño mediano que expresaba estas tres moléculas, y que podían presentar cuatro tipos de morfologías somatodendríticas diferentes: neuronas de soma ovoide con tres o cuatro dendritas, triangulares con el mismo número de prolongaciones primarias, bipolares y globulares de entre cinco y ocho dendritas primarias (Kowall y cols., 1987). El segundo trabajo fue realizado únicamente en el putamen, y en él se describe la presencia de doce tipos de neuronas en función de la forma del soma, número y morfología de las dendritas primarias, nivel de arborización dendrítica y simetría de la neurona (Johannes y cols., 2003).

En nuestra clasificación, hemos respetado en gran medida la descripción de Kowall y colaboradores (1987) aunque, a la hora de caracterizar sin lugar a dudas la morfología de una neurona, consideramos que era necesario introducir una serie de modificaciones en esta clasificación. En primer lugar, pensamos que los términos “globular” y “ovoide” podían ser confundidos al observar una neurona en un corte. Además, vimos otros tipos morfológicos que no habían sido descritos en este trabajo, como neuronas ovoides con una prolongación, o con dos dendritas primarias asimétricas, por lo que no podían ser consideradas bipolares. Por lo tanto, decidimos crear un único grupo de neuronas de soma ovoide que se diferenciaron en su número de dendritas primarias. Otro aspecto que consideramos importante fue la determinación de unos criterios objetivos para considerar a una neurona como de aspecto bipolar. Por ello, establecimos dos condiciones morfológicas: que las dos dendritas primarias fueran

del mismo grosor, y que su longitud fuera al menos igual a la del eje mayor del soma. Uno de los grupos morfológicos descritos en este trabajo y que puede ser controvertido es el de las neuronas triangulares, y su posible confusión con las neuronas ovoides de tres o cuatro dendritas primarias. En este sentido, lo primero que conviene considerar es que el grupo de neuronas nitrérgicas triangulares ha sido incluido en las otras dos clasificaciones previas, por lo que debemos suponer que se trata de un grupo morfológico fácilmente distinguible tras la observación de toda la población de interneuronas nitrérgicas estriatales. Además, ambas pueden distinguirse gracias a que las triangulares suelen ser mayores, y la forma de su soma es un triángulo equilátero bien definido. Aunque algunas de las neuronas ovoides con tres o cuatro dendritas primarias puedan presentar un soma con forma más o menos triangular, éste suele ser más abombado y fusiforme, siendo fácilmente identificable.

En cuanto a la clasificación de Johannes y colaboradores (2003), consideramos que una caracterización morfológica tan detallada puede ser muy útil para el estudio descriptivo de las neuronas nitrérgicas del estriado. Sin embargo, dado que el propósito final de nuestro estudio era el análisis de la distribución y de la organización compartimental de las neuronas nitrérgicas en general, y de sus distintos grupos morfológicos en particular, y no el estudio exhaustivo de la morfología de estas neuronas, consideramos que era conveniente emplear una clasificación más sencilla que la de Johannes y colaboradores (2003), y similar a la de Kowall y colaboradores (1987). En cualquier caso, conviene aclarar que los doce grupos descritos por los primeros fueron encontrados en nuestro material experimental, y todos ellos están incluidos en alguno de nuestros tres grupos morfológicos.

La presencia de los tres grupos morfológicos descritos en este trabajo se mantenía constante a lo largo de las distintas regiones del estriado humano, con pequeñas diferencias. Las neuronas ovoides eran las más abundantes en todos los territorios analizados, con una media superior al 80%. Su máxima presencia apareció en el cuerpo del núcleo caudado (91%), mientras que el putamen precomisural era la región con una menor abundancia de neuronas ovoides (76%). Estas pequeñas variaciones en la prevalencia de las neuronas ovoides se vieron correspondidas de un modo opuesto con la abundancia de las neuronas triangulares, que aumentaban su presencia en aquellas regiones en las que disminuía la de las neuronas ovoides (19% en el putamen precomisural, por ejemplo). Las neuronas de aspecto bipolar, sin embargo, se

distribuían de manera uniforme en los distintos territorios estriatales, con un porcentaje medio aproximado del 4%. Sólo superaron a las neuronas triangulares en el cuerpo del núcleo caudado, y fue debido a una disminución de las neuronas de soma triangular y no a un aumento llamativo del número de neuronas de aspecto bipolar. Por lo tanto, nuestro estudio demuestra por primera vez que la morfología de las neuronas nitrérgicas se conserva a lo largo del eje anteroposterior del estriado.

La segunda parte de este trabajo consistió en el análisis de la distribución de las neuronas nitrérgicas en toda la extensión del estriado humano. Nuestros resultados demuestran que las interneuronas nitrérgicas ocupan preferentemente las zonas posteriores del estriado, y que son más abundantes en el núcleo caudado que en el putamen. Dentro del núcleo caudado se distribuyen de un modo prácticamente homogéneo a lo largo de los ejes dorsoventral y mediolateral salvo en el giro, donde son más abundantes en la mitad dorsal. Sin embargo, su distribución en el putamen muestra notables diferencias en los ejes dorsoventral y mediolateral, ya que las zonas más densamente pobladas son el sector dorsolateral del putamen precomisural y la mitad lateral del putamen postcomisural. Además, aunque no se encontraron diferencias estadísticas, la mitad ventral del putamen postcomisural cuenta con una mayor densidad neuronal que la dorsal.

Hasta el momento, no se había realizado ningún trabajo semejante en cerebro humano. Como se ha indicado anteriormente, el primer estudio que aborda parcialmente este tema es el de Kowall y colaboradores (1987). Estos investigadores se centran en la colocalización de la enzima diaforasa, el neuropéptido Y y la somatostatina en el mismo tipo de neurona estriatal, y analizan de manera muy general su distribución en el estriado humano. Según ellos, estas neuronas tienen una distribución en forma de parches en cada corte y relativamente homogénea a lo largo del eje anteroposterior del estriado, sin encontrar un claro “gradiente ventromedial o dorsoventral” (Kowall y cols., 1987).

Un trabajo más reciente llevó a cabo el estudio de la distribución de las interneuronas nitrérgicas, con el objetivo de compararla con la presencia de otros tipos de interneuronas (calretinina y parvalbúmina positivas) en el estriado de la rata, el primate no humano, y el hombre (Wu y Parent, 2000). Estos investigadores dividen el estriado de los distintos especímenes en tres niveles anteroposteriores: rostral, medio y caudal. Según su división del estriado humano, el nivel rostral incluye niveles

precomisurales del núcleo caudado y del putamen; el nivel medio corresponde a la cabeza postcomisural del núcleo caudado y al putamen postcomisural anterior; y el nivel caudal incluye la parte posterior de la cabeza postcomisural del núcleo caudado y el inicio del cuerpo, y el putamen correspondiente a este nivel. Por lo tanto, estos autores no analizan regiones tan posteriores como la cola o el giro del núcleo caudado. Con respecto a la obtención de los datos, emplean el sistema informático NeuroLucida para el recuento de neuronas, que expresan en células por unidad de superficie ( $\text{mm}^2$ ). No emplearon técnicas estereológicas porque su propósito era la comparación de la presencia de los tres grupos neuronales en los tres niveles del estriado, y no la obtención de datos numéricos exactos acerca de la presencia de estas neuronas en esta región subcortical. Por lo tanto, al expresar la densidad neuronal en unidades distintas de las que empleamos nosotros, ambos trabajos no son comparables en el aspecto numérico. Sin embargo, ambos trabajos coinciden en afirmar que las neuronas nitrérgicas son más abundantes en el núcleo caudado que en el putamen. La principal diferencia entre los resultados de este trabajo y el nuestro es la diferente densidad neuronal en los niveles anteriores y posteriores del estriado. Mientras que Wu y Parent (2000) no encuentran diferencias entre los tres niveles, en nuestro trabajo los territorios posteriores presentan una mayor densidad neuronal. Aunque la división topográfica haya sido distinta, los resultados descritos en nuestro estudio muestran una gran diferencia ya entre la cabeza precomisural y postcomisural del núcleo caudado. La explicación de los diferentes resultados obtenidos en uno y otro trabajo queda aún por determinar, pero podría deberse a la diferente metodología empleada en el recuento celular.

En cuanto a la distribución de estas neuronas en los ejes dorsoventral y mediolateral, no existen trabajos previos que hayan analizado este aspecto. Según ha demostrado nuestro estudio, las neuronas nitrérgicas tienen una distribución homogénea en la porción anterior del núcleo caudado, mientras que en la cabeza postcomisural y en el giro tienden a ocupar preferentemente la mitad dorsal. En el putamen precomisural, el sector que alberga una mayor densidad neuronal es el dorsolateral, mientras que en el putamen postcomisural es la mitad ventral la que posee una mayor densidad de interneuronas nitrérgicas. Este último aspecto resulta interesante porque el putamen postcomisural es la única región del estriado en la que la densidad de estas neuronas es mayor en la mitad ventral. Según se ha descrito, en el putamen posterior a la comisura anterior existe una representación somatotópica del cuerpo, quedando el área del “pie”



en posición dorsal, y la de la “cara” en posición ventral (Kunzle, 1975; Alexander y DeLong, 1985; Kimura, 1990; 1992; Flaherty y Graybiel, 1993; Parent y Hazrati, 1995; Lehericy y cols., 1998; Gerardin y cols., 2003). Por lo tanto, las neuronas nitrérgicas serían más abundantes en aquella región correspondiente a la “cara”.

Aunque no se conozca el significado funcional exacto de la distribución preferente de las interneuronas en algunas regiones estriatales, podrían obtenerse algunas conclusiones funcionales. El hecho de que en el ser humano haya cinco veces más interneuronas que en la rata (Graveland y DiFiglia, 1985; Roberts y cols., 1996) hace suponer que este tipo de neuronas está implicado en un procesamiento más complejo de la información. Por lo tanto, aquellas zonas del estriado que posean un mayor número de interneuronas deberán también poseer un mayor grado de complejidad integrativa. Así, según los resultados de nuestro estudio, las regiones posteriores del núcleo caudado, especialmente el cuerpo y el giro, podrían estar implicadas en un complejo procesamiento de la información nerviosa, que parece proceder en su mayoría de cortezas asociativas (Giménez-Amaya y Graybiel, 1991). El núcleo caudado es considerado completamente asociativo, salvo una pequeña parte del sector dorsolateral de su cabeza postcomisural (Parent, 1990; Parent y Hazrati, 1995). Sin embargo, las conexiones de la parte posterior del cuerpo del núcleo caudado y de su giro y cola no han sido estudiadas en profundidad. Su alta densidad interneuronal hace suponer que realmente todas ellas están implicadas en procesos de integración asociativos, quizá como eslabones subcorticales de la conectividad corticocortical.

El putamen es considerado un núcleo asociativo y sensorimotor (Parent, 1990; Parent y Hazrati, 1995), lo cual explicaría su menor densidad interneuronal con respecto al núcleo caudado. Sin embargo, el hecho de que el putamen postcomisural, territorio sensorimotor por excelencia, tenga una mayor densidad neuronal que el putamen precomisural, considerado en su mayoría asociativo, contradice de algún modo la línea de razonamiento seguida hasta ahora. Una posible explicación a esta contradicción enlaza con el siguiente tema de esta *Discusión*, y que trata sobre la relación de las interneuronas nitrérgicas con el compartimento estriosomal. Como ha sido descrito desde los primeros estudios acerca de los estriosomas, éstos son más claros en el núcleo caudado y en el putamen postcomisural, mientras que en el putamen precomisural sus límites son más difusos (Graybiel y Ragsdale, 1978; Graybiel y cols., 1981; Graybiel y cols., 1986; Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1999). Dado que las interneuronas

parecen tener un papel integrador entre los distintos compartimentos bioquímicos estriatales (Kawaguchi, 1993; Prensa y cols., 1999; Saka y cols., 2002; Bernácer y cols., 2005), la mayor presencia de interneuronas nitrérgicas en el putamen postcomisural se podría justificar por la necesidad de una mayor integración entre los distintos compartimentos estriatales, algo que no sería tan necesario en el putamen precomisural al no tener una expresión estriosomal tan llamativa. Este tema volverá a tratarse en profundidad más adelante en este mismo apartado.

Al contrario que el estudio de la distribución general de las interneuronas nitrérgicas, su organización compartimental ha sido analizada en varias especies y en diferentes trabajos (Chesselet y Graybiel, 1986; Ferrante y cols., 1987; Kowall y cols., 1987; Kubota y Kawaguchi, 1993; Kawaguchi y cols., 1995; Holt y cols., 1997; Prensa y cols., 1999; Saka y cols., 2002; Bernácer y cols., 2005). Todos ellos coinciden en su prevalencia en la matriz con respecto al compartimento estriosomal, pero también describen su presencia en los bordes entre ambos compartimentos, e incluso en el interior de los estriosomas. Como explicaron Bolam y colaboradores (1988), en el estriado del gato y del hurón parece existir una organización citológica en torno a los estriosomas, de manera que gran parte de las neuronas de proyección alteran la dirección de sus prolongaciones para no invadir el otro compartimento químico con respecto al cual se encuentran. Sin embargo, las prolongaciones de todas las interneuronas nitrérgicas próximas a los bordes entre los distintos compartimentos atraviesan sus límites, constituyendo un medio de comunicación e integración entre la matriz y los estriosomas (Kubota y Kawaguchi, 1993). Prensa y colaboradores (1999) describieron por primera vez la presencia de estas neuronas tanto en el centro y en la periferia estriosomal como en el límite entre ambos compartimentos estriosomales del cerebro humano. Debido a que este trabajo no incluía los niveles más posteriores del estriado, el presente estudio ha tratado de completar la información existente en todas las regiones del núcleo caudado y del putamen (Bernácer y cols., 2005).

De acuerdo con nuestras observaciones, las neuronas nitrérgicas se relacionan con el compartimento estriosomal en todas las regiones del estriado, aunque muestran una cierta heterogeneidad en cuanto a su organización compartimental. Así, la cabeza precomisural del núcleo caudado y el putamen postcomisural son las regiones en las que aparece un mayor número de interneuronas en relación con los estriosomas. Además, en estos territorios aparece una mayor riqueza en cuanto a la relación entre ambos

elementos, ya que se encontraron interneuronas en el centro, la periferia y los bordes de la gran mayoría de los estriosomas. Por otra parte, su presencia en los estriosomas de la cabeza postcomisural del núcleo caudado y del putamen precomisural es también elevada, aunque menor que en los territorios citados previamente. La principal diferencia es la baja presencia de neuronas en el borde entre el centro y la periferia de los estriosomas de la cabeza postcomisural del núcleo caudado y del putamen precomisural. Sin embargo, conviene aclarar que la presencia de las interneuronas nitrérgicas en el centro estriosomal es mayor en la cabeza del núcleo caudado (precomisural y postcomisural) que en cualquiera de los dos territorios del putamen. Una tercera situación se daría en la porción posterior del núcleo caudado, donde las interneuronas tienden a dejar el interior de los estriosomas y a situarse en los bordes entre ambos compartimentos estriatales.

Estos resultados implicarían que la labor de las interneuronas nitrérgicas como integradoras de la información de los dos compartimentos del estriado se conservaría a lo largo de toda la extensión anteroposterior de esta estructura subcortical. Como se ha mencionado en párrafos anteriores, la mayor densidad neuronal del núcleo caudado con respecto al putamen resulta lógica si se tiene en cuenta que el primero se encuentra implicado en funciones de integración nerviosa más complejas que el segundo (Miyachi y cols., 2002; Lehericy y cols., 2006). Por otra parte, la presencia de interneuronas en todos los compartimentos químicos de ambas estructuras estriatales invita a pensar que tanto el núcleo caudado como el putamen necesitan coordinar la información presumiblemente de gran componente límbico de los estriosomas con otra de tipo asociativo o sensorimotor de la matriz. Es decir, la integración de los distintos tipos de información nerviosa es necesaria independientemente de la complejidad de las funciones de las distintas regiones estriatales. En un estudio reciente, Saka y colaboradores (2002) describieron que, al aplicar agonistas dopaminérgicos al estriado de la rata, los estriosomas mostraban una mayor activación de genes de expresión temprana. Sin embargo, cuando se eliminaban las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas con la neurotoxina SP-PE35, el patrón de activación cambiaba y era mayor en la matriz. Este hecho demuestra la importancia de la localización específica de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas en la organización morfofuncional de los distintos compartimentos estriatales.

Para alcanzar una mayor comprensión de las posibles implicaciones funcionales de la distribución y organización compartimental de las neuronas nitrérgicas, es necesario conocer de qué manera éstas son capaces de interaccionar con otros elementos y procesos en los cuales el estriado juega un papel importante.

Como se ha mencionado anteriormente, las interneuronas nitrérgicas expresan principalmente somatostatina, neuropéptido Y, GABA y óxido nítrico sintasa neuronal. La presencia de somatostatina en el cerebro humano parece relacionarse con la regulación de la secreción de hormonas, procesos cognitivos, memoria, regulación autónoma y actividad motora (Chesselet y cols., 1995). En el estriado, modula a las neuronas de proyección actuando sobre sus canales de calcio y, probablemente, de potasio (Vilchis y cols., 2002). Esto trae como consecuencia una alteración en el patrón de descarga de las neuronas de proyección, que se vuelve irregular. Actúa a través de cinco receptores distintos (Hoyer y cols., 1995), y todos ellos parecen estar en el estriado (Martin y cols., 1991).

El neuropéptido Y se ha encontrado en los ganglios basales, el complejo amigdalino, la formación del hipocampo, el hipótalamo, y en algunas regiones corticales (Dawbarn y cols., 1984). Se le relaciona con la estimulación de la alimentación, cambios en los ritmos circadianos, alteraciones en los niveles hormonales, una mayor retención de la memoria y el control de la presión sanguínea (Lehmann y cols., 1990). También puede estar implicado en trastornos psiquiátricos como la depresión (Widerlov y cols., 1988). Su actividad parece estar ligada a los niveles de dopamina, ya que la infusión de neuropéptido Y en los ventrículos cerebrales promueve la síntesis, liberación y movilización de dopamina (Beal y cols., 1986). Parece que la expresión de somatostatina y neuropéptido Y durante la enfermedad de Parkinson se ve aumentada en el estriado (Eve y cols., 1997; Cannizzaro y cols., 2003), lo cual lleva a pensar que su síntesis y liberación pueda estar inhibida por la dopamina liberada en las terminales nigroestriatales, que degeneran en esta enfermedad.

La naturaleza gabaérgica de las interneuronas nitrérgicas resultaba un asunto contradictorio en la década de los noventa. En ratas que habían sido tratadas con colchicina, alcaloide que impide la correcta formación del citoesqueleto, las neuronas nitrérgicas parecían expresar marcadores gabaérgicos como el GAD<sub>67</sub>. Sin embargo, este marcaje desaparecía en las ratas que no habían sido tratadas (Kawaguchi y cols., 1995). La explicación a este fenómeno que dan Kawaguchi y colaboradores (1995) es

que el GABA de las interneuronas tiende a abandonar rápidamente el soma y se distribuye a lo largo de su axón, siendo muy difícil de detectar por técnicas inmunohistoquímicas. Cuando las ratas son tratadas con colchicina, el transporte axonal se ve muy reducido y el GABA se conserva en el soma, siendo fácilmente detectable. En el año 2000, Kubota y Kawaguchi confirmaron la naturaleza gabaérgica de estas interneuronas (Kubota y Kawaguchi, 2000) y, en un trabajo más reciente, Tepper y Bolam (2004) ya incluyen a las neuronas nitrérgicas entre las interneuronas gabaérgicas estriatales.

Sin embargo, la característica bioquímica más distintiva de este grupo de interneuronas es la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal, con la consiguiente síntesis de óxido nítrico. El óxido nítrico es un gas difusible a través de la membrana celular, que en principio fue descrito como un factor relajante derivado del endotelio (Palmer y cols., 1987). Pronto se descubrió que la parte del cuerpo en la que más se expresaba era el cerebro, y que su principal función era la neurotransmisión (Garthwaite y Boulton, 1995). El proceso por el cual se sintetiza óxido nítrico en una neurona es el siguiente: cuando los receptores de glutamato de tipo NMDA son activados en la neurona nitrérgica, se produce un aumento de calcio en su interior, y se forma el complejo calcio/calmodulina. Éste activa a la enzima óxido nítrico sintasa neuronal, que convierte al aminoácido L-arginina en citrulina y óxido nítrico (Garthwaite y Boulton, 1995). Los dominios PDZ de la enzima sintetizadora del óxido nítrico hacen que esté anclada a la membrana en lugares próximos a las sinapsis, por lo que el óxido nítrico, a pesar de ser un gas difusible, es liberado principalmente en el espacio sináptico (Brenman y Bredt, 1997).

El receptor más habitual del óxido nítrico es la guanilato ciclasa soluble, una proteína citoplasmática con la capacidad de activar trinucleótidos de guanina y producir la activación de enzimas quinasas (Centonze y cols., 2001). El óxido nítrico, al ser un radical libre, también puede unirse al ión superóxido y formar peroxinitrito, que en este caso activará a enzimas fosfatasas (Trabace y Kendrick, 2000). Por lo tanto, los efectos del óxido nítrico serán distintos según siga una u otra vía. La respuesta global de la neurona o terminal que recibe el óxido nítrico es la liberación de acetilcolina, serotonina, glutamato o GABA si posee guanilato ciclasa soluble, o la liberación de dopamina si el óxido nítrico se transforma en peroxinitrito (Trabace y Kendrick, 2000). Paradójicamente, un exceso de peroxinitrito inhibe la liberación de dopamina. En

resumen, el óxido nítrico parece excitar a las neuronas de proyección estriatales (West y Grace, 2004), a las interneuronas colinérgicas (Centonze y cols., 2001), y modula la liberación tónica y fásica de dopamina en el estriado normal (West y cols., 2002).

Volviendo a los aspectos neuroanatómicos de estas neuronas, se ha visto que reciben conexiones aferentes desde la corteza cerebral, la porción compacta de la sustancia negra, las interneuronas colinérgicas, y las colaterales de las neuronas de proyección que expresan sustancia P (Vuillet y cols., 1992; Kawaguchi y cols., 1995; Li y cols., 2002b; Li y cols., 2002a). A su vez, envían sus axones a las interneuronas colinérgicas y a las neuronas de proyección, y establecen contactos presinápticos con las terminales glutamatérgicas y dopaminérgicas del estriado (Kawaguchi y cols., 1995; Centonze y cols., 1999; Centonze y cols., 2001; Hidaka y Totterdell, 2001; Chiken y cols., 2003). Funcionalmente, destacan sus receptores de sustancia P NK-1, a través de los cuales se estimula la liberación de óxido nítrico (Li y cols., 2002b; Saka y cols., 2002), y sus receptores de dopamina D<sub>5</sub>, que parecen expresarse preferentemente en las interneuronas estriatales (Rivera y cols., 2002).

Todos estos datos sitúan a las interneuronas nitrérgicas en un lugar fundamental no sólo para coordinar las conexiones intrínsecas del estriado, sino también para regular sus conexiones aferentes y sus neuronas de proyección. Es lógico pensar que en aquellas regiones en las que estas interneuronas son más abundantes (el giro y el cuerpo del núcleo caudado) los efectos del óxido nítrico se verán potenciados. Éstos se pueden resumir en una facilitación de la liberación de GABA en las neuronas de proyección, y en una regulación de las terminales nigroestriatales en función de la abundancia de ión superóxido.

#### ***5.4. Interneuronas estriatales colinérgicas***

Hasta el momento, ningún trabajo había llevado a cabo el análisis en profundidad de la distribución de las interneuronas colinérgicas en toda la extensión del estriado humano. Otros estudios habían comparado la presencia de este tipo celular en el estriado de individuos sin alteraciones neurológicas o psiquiátricas con la de pacientes con alguno de estos trastornos en ciertas regiones anteriores del estriado (Holt y cols., 1999; Holt y cols., 2005; Warren y cols., 2005). En nuestra opinión, es conveniente conocer en primer lugar si estas interneuronas se distribuyen de un modo heterogéneo

en el estriado humano normal, para después abordar el estudio en pacientes con alteraciones neurológicas o psiquiátricas.

Según el presente estudio, las interneuronas colinérgicas tienen una distribución marcadamente heterogénea a lo largo de todo el estriado humano, en el que las principales diferencias aparecen al comparar el núcleo caudado con el putamen, y los territorios postcomisurales con los precomisurales, siendo más densamente poblados los citados en primer lugar. Además, nuestro trabajo demuestra por primera vez que la organización compartimental de las interneuronas colinérgicas tampoco es homogénea en el eje anteroposterior del estriado y que, de hecho, no aparecen en contacto con los estriosomas en las porciones más posteriores del núcleo caudado.

La primera parte del presente análisis consistió en el estudio morfológico de las interneuronas estriatales colinérgicas. En principio, se intentó hacer un estudio similar al llevado a cabo en las interneuronas nitrérgicas, y agrupar a las colinérgicas según su morfoloía. Sin embargo, debido a su gran diversidad morfológica y a las dificultades para clasificarlas en grupos morfológicos que resultaran objetivamente diferenciables, optamos por renunciar a este tipo de clasificación y recurrir al análisis cuantitativo de su morfoloía, es decir, el volumen del soma. Los resultados de esta parte del estudio demostraron que las células con mayor volumen se encontraban en el giro y la cabeza precomisural del núcleo caudado, y en el putamen precomisural, mientras que mantenían unos valores homogéneos en las otras cuatro regiones en las que subdividimos el estriado humano. Las diferencias entre los territorios precomisurales y postcomisurales alcanzaron significación estadística tanto en el núcleo caudado como en el putamen, en ambos casos a favor de las regiones precomisurales. Resulta interesante observar que los territorios en los que el volumen del soma es mayor son aquellos que están menos densamente poblados por estas interneuronas. Como será discutido en los párrafos siguientes, y ya se ha expuesto en los **Resultados**, la densidad neuronal era mayor en el cuerpo, cola y cabeza postcomisural del núcleo caudado, regiones en las que el soma de las neuronas colinérgicas tiene menor volumen. Por otra parte, los territorios posteriores tendían a presentar una mayor densidad de estas interneuronas con respecto a los anteriores, y en el caso del volumen del soma neuronal este patrón se invierte. Por lo tanto, según nuestros resultados, parece haber un mecanismo por el cual las interneuronas colinérgicas intentan compensar su menor número aumentando de volumen.

Algunos trabajos previos encontraron diferencias en el tamaño de las interneuronas colinérgicas entre el estriado dorsal y ventral (Mesulam y cols., 1984; Lehericy y cols., 1989; Holt y cols., 1996; Brauer y cols., 2000; Prensa y cols., 2003), o entre el núcleo caudado y el putamen (Holt y cols., 1996). Sin embargo, ninguno de ellos analizó las posibles diferencias entre los distintos territorios estriatales en el eje anteroposterior.

El estudio de la distribución de las interneuronas colinérgicas a lo largo de toda la extensión del estriado humano aportó, como en el caso de las nitrérgicas, datos novedosos y de interesantes aplicaciones funcionales. La aplicación de la metodología estereológica reveló que las regiones estriatales más pobladas por las interneuronas colinérgicas eran el cuerpo, la cola, y la cabeza postcomisural del núcleo caudado. Tanto el límite posterior del núcleo (el giro) como el anterior (la cabeza precomisural) tenían una menor densidad que, en cualquier caso, era claramente mayor en el giro. Las dos regiones del putamen eran las que presentaban una menor densidad de todo el estriado, siendo mayor la del territorio postcomisural. La principal conclusión que se desprende de estos resultados es la prevalencia de las interneuronas colinérgicas en el núcleo caudado con respecto al putamen, y en los territorios postcomisurales de ambas estructuras estriatales con respecto a los precomisurales. Además, el análisis de la distribución en los ejes dorsoventral y mediolateral demostró que esta población interneuronal tiende a situarse en las porciones dorsomediales del núcleo caudado y dorsolaterales del putamen.

Hasta el momento, ningún trabajo había demostrado la distribución selectiva de las interneuronas colinérgicas en el estriado humano control o con alteraciones patológicas. Mesulam y colaboradores (1984), en un trabajo acerca de la presencia de marcadores colinérgicos en distintas regiones del cerebro del macaco, dibujaron la distribución de las neuronas colinérgicas en distintos niveles del estriado. Sin embargo, describieron únicamente su distribución en cada corte, donde “no siguen una distribución uniforme, sino que se concentran en parches poco definidos” (Mesulam y cols., 1984). Según ellos, el estriado ventral contiene más neuronas colinérgicas que el dorsal. De sus dibujos se deduce que la densidad en los territorios posteriores es mayor que en los anteriores, aunque este aspecto no es incluido en los resultados ni posteriormente discutido.



Kubota y Kawaguchi (1993), en un estudio acerca de la distribución espacial de las distintas poblaciones de interneuronas en el estriado de la rata, describen la escasa presencia de las neuronas colinérgicas en las zonas estriatales próximas a la cápsula interna y al globo pálido, coincidiendo así con nuestros resultados en el cerebro humano. Posteriormente, Holt y colaboradores (1996) analizaron la distribución del neuropilo colinérgico y de estas interneuronas en el cerebro humano normal, pero no incluyeron en sus comparaciones la densidad de los distintos niveles estriatales anteroposteriores analizados. Encontraron en el estriado tres grados de marcaje del neuropilo colinérgico: intenso, presente en la parte dorsal de la cabeza del núcleo caudado, en su cuerpo, y en el putamen dorsomedial; moderado, en porciones más laterales y ventrales del estriado; y débil, intercalado entre las zonas de marcaje moderado. Según estos autores, la densidad de neuronas colinérgicas es mayor en la zona con un grado intenso de marcaje, mientras que la de los niveles moderado y débil es similar en territorios anteriores, y mayor en el nivel moderado con respecto al débil en territorios posteriores. Comparando este estudio con el nuestro, ambos coinciden en que la mayor densidad neuronal aparece en la zona dorsal de la cabeza y en el cuerpo del núcleo caudado, aunque no es así en la parte dorsolateral del putamen, donde nosotros encontramos una baja densidad de interneuronas. En trabajos posteriores de estos autores, en los que se analiza la distribución de las interneuronas estriatales colinérgicas en cerebros normales y procedentes de pacientes esquizofrénicos, atribuyen al núcleo caudado, al putamen y al estriado ventral de los cerebros controles densidades neuronales similares, aunque estas no están medidas en toda la extensión anteroposterior del estriado (Holt y cols., 2005).

Pese a que algunos trabajos habían descrito que la distribución de las interneuronas colinérgicas en el estriado era homogénea, y que la compartimentación química del neuropilo colinérgico no podía deberse a la selectiva organización de las interneuronas (Kimura y cols., 1980; Kimura y cols., 1981; Graybiel y cols., 1986; Mesulam y cols., 1992), nuestro trabajo confirma las observaciones de Holt y colaboradores (1999) acerca de la distribución heterogénea de las interneuronas estriatales colinérgicas en el cerebro humano, y además corrobora que esta distribución selectiva se da también en el eje anteroposterior del estriado. Además, como apuntan estos investigadores (Holt y cols., 1999), la distribución heterogénea de las interneuronas colinérgicas hace que los trabajos que analizan la cantidad de marcadores

colinérgicos en el estriado con técnicas de cuantificación que requieren la homogeneización del tejido puedan no ser exactos. De hecho, hay estudios que demuestran que las interneuronas colinérgicas en cerebros procedentes de pacientes esquizofrénicos pueden sufrir un descenso (Bird y cols., 1979) o un aumento (McGeer y McGeer, 1977) en su densidad, o que incluso pueden no sufrir ningún cambio (Cross y Owen, 1979). Estas diferencias pueden ser debidas a las distintas técnicas de cuantificación empleadas, o a la inclusión de determinadas regiones estriatales en el estudio, ya que la pérdida de interneuronas colinérgicas en la esquizofrenia parece ser selectiva desde el punto de vista regional (Holt y cols., 1999; Holt y cols., 2005).

Las diferencias en la densidad neuronal entre el núcleo caudado y el putamen apoyan los hallazgos discutidos anteriormente en cuanto a la distribución de las interneuronas nitrérgicas (Bernácer y cols., 2005), y tienen una idéntica interpretación: la abundancia de interneuronas en el núcleo caudado con respecto al putamen podría relacionarse con su implicación en funciones cognitivas más complejas (Monchi y cols., 2001; Miyachi y cols., 2002; Benke y cols., 2003; Cerasa y cols., 2005). Estas dos poblaciones de interneuronas siguen una distribución muy similar, aunque las nitrérgicas son mucho más numerosas. La diferencia más llamativa entre los dos tipos de interneuronas es su presencia en el giro del núcleo caudado. Mientras que ésta es la región más densamente poblada por las neuronas nitrérgicas, en el caso de las colinérgicas es el territorio postcomisural con una menor densidad neuronal. Las diferencias encontradas también en la organización compartimental de las interneuronas colinérgicas, que serán discutidas más adelante, confirman la peculiaridad de la presencia de esta población de neuronas en el giro del núcleo caudado. Debido a la falta de datos referentes a la conectividad y funcionalidad de esta región, resulta difícil darle una interpretación funcional precisa a estas diferencias.

Otro rasgo distintivo interesante con respecto a la distribución de los tipos neuronales discutidos hasta el momento es la abundancia de las neuronas colinérgicas en el sector dorsomedial del núcleo caudado, y en el dorsolateral del putamen postcomisural. Como se ha explicado anteriormente, las interneuronas nitrérgicas seguían una distribución prácticamente uniforme en el núcleo caudado, y parecían concentrarse en la mitad ventral del putamen postcomisural. Atendiendo a las características conectivas de estas dos poblaciones de interneuronas, las nitrérgicas reciben preferentemente conexiones desde la corteza cerebral, mientras que las

colinérgicas lo hacen desde el tálamo (Vuillet y cols., 1989a; Lapper y Bolam, 1992; Kawaguchi y cols., 1995; Kelley y cols., 2005). Estas diferencias podrían resultar importantes a la hora de interpretar la prevalencia de unas u otras interneuronas en las distintas zonas del estriado, de modo que en el sector dorsomedial del núcleo caudado y en el putamen postcomisural dorsolateral podría ser necesaria una mayor regulación de las conexiones aferentes talámicas con respecto a las corticales, hecho que se produciría a través de las interneuronas colinérgicas. De la misma manera, en el giro del caudado prevalecería el control de las conexiones aferentes corticales llevado a cabo por las interneuronas nitrérgicas.

En cuanto a la organización compartimental de las interneuronas colinérgicas, ha habido diversos estudios en la rata (Kubota y Kawaguchi, 1993), en el gato (Martone y cols., 1993; Martone y cols., 1994), y en el hombre (Holt y cols., 1996; Prensa y cols., 1999) que han abordado este tema. Según nuestros resultados, las interneuronas colinérgicas ocupan tanto la matriz como los estriosomas en toda la extensión del estriado humano salvo en el giro del núcleo caudado, donde no aparecen ni en el interior ni en los bordes del compartimento estriosomal. Además, la cantidad de interneuronas colinérgicas dentro de los estriosomas es mayor en la cabeza precomisural del núcleo caudado y en el putamen postcomisural que en el resto de regiones estriatales. En general, estas interneuronas son poco abundantes en el centro estriosomal (caracterizado por una escasa inmunorreactividad frente a encefalina) en todas las regiones estriatales estudiadas; están especialmente presentes, sin embargo, en los estriosomas encontrados en el putamen. Por el contrario, este tipo de neuronas colinérgicas tiende a ocupar los bordes de los distintos compartimentos en el núcleo caudado, mientras que en el putamen son menos numerosas en esas zonas. La organización compartimental de estas interneuronas en los distintos territorios del putamen apenas sufre cambios, mientras que en el núcleo caudado resulta muy llamativa la forma en que los estriosomas quedan despoblados de somas colinérgicos en el giro del núcleo caudado.

El primer trabajo que analizó en profundidad la presencia de las interneuronas colinérgicas con respecto a los estriosomas fue el de Kubota y Kawaguchi (1993), llevado a cabo en rata. En él, estos autores describieron que estas interneuronas tendían a aparecer en la matriz y especialmente en torno a los estriosomas, mientras que su presencia en el interior de los llamados “parches” era muy pequeña (inferior al 1%) (Kubota y Kawaguchi, 1993). Además, en este mismo trabajo se observó que las

neuronas colinérgicas tendían a situarse en las proximidades de los estriosomas, y que sus prolongaciones solían cruzar ambos compartimentos estriatales.

Resultados más llamativos aparecen en los estudios llevados a cabo en el estriado del gato por Martone y colaboradores (1993; 1994). Según estos autores, las interneuronas colinérgicas son más abundantes en los “parches” inmunorreactivos frente a la sustancia P y a la encefalina. Aunque dichos investigadores aclaran que los “parches” a los que se refieren no coinciden completamente con los estriosomas, resulta llamativo que en el estriado del gato las interneuronas colinérgicas fueran mucho menos numerosas en la matriz que en estos “parches”, más aún cuando en la rata y en el hombre se han descrito resultados contrarios. A pesar de todo, las imágenes que muestran Martone y colaboradores (1994) acerca de la colocalización del marcaje de encefalina y colina acetiltransferasa son muy similares a las obtenidas tanto en nuestro trabajo como en otros ya citados (Kubota y Kawaguchi, 1993; Prensa y cols., 1999). Los autores se basan en los recuentos llevados a cabo con una cámara clara acoplada a un microscopio para afirmar la distribución selectiva de las neuronas colinérgicas en los parches ricos en neuropéptidos. La diferente interpretación de los resultados en estos trabajos puede deberse a que Martone y colaboradores sólo estudiaron la cabeza del núcleo caudado que, según el presente trabajo, es la región en la que aparece un mayor número de interneuronas colinérgicas en el interior de los estriosomas.

Como se ha descrito en numerosos trabajos, las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas son las principales candidatas para realizar la integración de la información que procesan la matriz y los estriosomas (Kowall y cols., 1987; Kubota y Kawaguchi, 1993; Kawaguchi y cols., 1995; Van Vulpén y Van Der Kooy, 1996; Blanchet y cols., 1997; Prensa y cols., 1999; Saka y cols., 2002; Bernácer y cols., 2005). Según se muestra en nuestros resultados, la relación de estas interneuronas con los bordes del compartimento estriosomal no es homogénea a lo largo del eje anteroposterior del estriado, hecho que debería tenerse en cuenta. Como se ve en las gráficas comparativas de las Figuras 46 y 47, la presencia de ambas poblaciones de interneuronas en el borde de los distintos compartimentos estriatales es similar en la cabeza precomisural del núcleo caudado. Sin embargo, en la cabeza postcomisural del núcleo caudado son las neuronas colinérgicas las que ocupan preferentemente esta zona, mientras que en las regiones posteriores del núcleo las interneuronas nitrérgicas son mucho más abundantes en el borde estriosomal que las colinérgicas. En el putamen, el patrón es más

homogéneo entre los territorios precomisurales y postcomisurales, y son las neuronas nitrérgicas las que suelen ocupar el límite entre la matriz y los estriosomas, aunque las colinérgicas son más abundantes en el límite entre el centro y la periferia de los estriosomas en el putamen precomisural.

Relacionando estos datos con los obtenidos tras el estudio de la distribución neuronal, se observa que las neuronas colinérgicas parecen estar menos implicadas en la comunicación entre los distintos compartimentos en el giro del núcleo caudado, ya que su densidad sufre una gran disminución y pierden su relación con los estriosomas. Se podría pensar que el segundo hecho es consecuencia del primero, pero se debe tener en cuenta que esto no sucede en la cabeza precomisural del núcleo caudado, en donde las neuronas colinérgicas son poco abundantes, y aun así aparecen en estrecho contacto con los estriosomas.

Otro aspecto de gran importancia a la hora de valorar el papel funcional las interneuronas colinérgicas en el interior de los estriosomas es la escasa cantidad de acetilcolinesterasa que hay en ellos. Como se ha dicho anteriormente, esta enzima es la responsable de la degradación de la acetilcolina en el espacio sináptico, por lo que un descenso en los niveles de acetilcolinesterasa se traduce en un incremento en los de acetilcolina. Esto significaría que en aquellos estriosomas con neuronas colinérgicas en el interior, que son la mayoría en todas las regiones estriatales salvo en el giro del núcleo caudado, habría una mayor cantidad de acetilcolina con respecto a la matriz. Este aspecto será tratado con mayor profundidad en los párrafos siguientes, en los que se tratarán los aspectos funcionales de estas interneuronas.

Como se ha dicho anteriormente, las interneuronas colinérgicas reciben fundamentalmente axones procedentes del tálamo y de la corteza cerebral (Lapper y Bolam, 1992), de la porción compacta de la sustancia negra (Chang, 1988; Cragg, 2006), de las neuronas de proyección con encefalina y sustancia P (Martone y cols., 1992), y de las interneuronas gabaérgicas y nitrérgicas (Kawaguchi y cols., 1995; Centonze y cols., 2001). Los efectos excitatorios del glutamato liberado por las terminales corticales y talámicas se dan a nivel de receptores NMDA y AMPA (Blanchet y cols., 1997; Centonze y cols., 1999), mientras que la dopamina puede actuar a través de receptores del tipo D<sub>2</sub>, inhibiendo a las interneuronas colinérgicas o, en menor medida, a través de receptores del tipo D<sub>1</sub> (probablemente D<sub>5</sub>), excitándolas (Blanchet y cols., 1997; Rivera y cols., 2002). La sustancia P tiene efectos excitatorios

al actuar sobre los receptores NK1, mientras que la encefalina inhibe a las interneuronas colinérgicas al unirse a sus receptores  $\delta$  opioides (Blanchet y cols., 1997). El GABA inhibe a estas interneuronas a través de receptores GABA B (Waldvogel y cols., 2004), mientras que el óxido nítrico, como se ha dicho en el anterior apartado, excita a las interneuronas colinérgicas que contienen guanilato ciclasa soluble (Centonze y cols., 2001).

Por otra parte, la acetilcolina inhibe presinápticamente la liberación de GABA y glutamato a través de receptores muscarínicos  $M_2$ , y la activa por mediación de receptores  $M_1$  (Galarraga y cols., 1999; Calabresi y cols., 2000a). A través de receptores nicotínicos, este neurotransmisor es capaz de favorecer presinápticamente la liberación de dopamina en las terminales nigroestriatales, y la de GABA en las interneuronas (Zhou y cols., 2002; Cragg, 2006). De hecho, las interneuronas colinérgicas inhiben su propia actividad a través de receptores  $M_2$  (Calabresi y cols., 2000a). Además, es importante señalar que estas interneuronas tienen un patrón de descarga peculiar, ya que son las únicas neuronas estriatales tónicamente activas (TANs, acrónimo del inglés *tonically active neurons*) (Aosaki y cols., 1994b; Aosaki y cols., 1995; Bennett y cols., 2000; Pisani y cols., 2001; Apicella, 2002). En cualquier caso, es posible que no todas las neuronas colinérgicas tengan una descarga tónica, y que no todas las TANs del estriado manifiesten un fenotipo colinérgico (Tepper y Bolam, 2004), aunque la correspondencia entre las interneuronas colinérgicas y las TANs es aceptada en la mayor parte de los estudios realizados (véanse, por ejemplo, los siguientes trabajos: Centonze y cols., 1999; Calabresi y cols., 2000a; Apicella, 2002; Zhou y cols., 2002; Cragg, 2006).

En síntesis, las interneuronas estriatales colinérgicas descargan acetilcolina constantemente, que es retirada del espacio sináptico por la acetilcolinesterasa. Cuando se presenta un estímulo que conlleva obtener una recompensa o evitar un proceso desagradable, el glutamato liberado sobre las neuronas colinérgicas hace que cambien las propiedades de su membrana y dejen de disparar durante aproximadamente 200 milisegundos (Aosaki y cols., 1995; Tepper y Bolam, 2004). Esta pausa se traduce en una activación de las neuronas de proyección y en una inhibición de las interneuronas gabaérgicas (Galarraga y cols., 1999; Koós y Tepper, 2002), lo cual causa una inhibición de los núcleos de salida de los ganglios basales, con la consecuente activación del tálamo y de la corteza cerebral (Calabresi y cols., 2000a; Zhou y cols.,

2002). Aún no se ha logrado resolver la paradoja que surge de que las interneuronas colinérgicas liberen acetilcolina *in vitro* por la acción del glutamato, y sin embargo cesen su descarga tras la estimulación *in vivo* (Blanchet y cols., 1997; Zhou y cols., 2002). Sin embargo, en esta **Discusión** se tomará como cierto el proceso siguiente: estímulo -- pausa de las TANs -- disminución de los niveles de acetilcolina -- respuesta, ya que ha sido sobradamente probado (Zhou y cols., 2002; Tepper y Bolam, 2004; Cragg, 2006).

La respuesta de las TANs es distinta en el núcleo caudado y en el putamen según el tipo de estímulo que se presente (Yamada y cols., 2004). Así, los estímulos asociados a un procesamiento más complejo de la información dan como consecuencia que la pausa de las TANs se produzca preferentemente en el núcleo caudado. Sin embargo, aquéllos asociados a un simple movimiento, como puede ser la liberación de una palanca, hacen que la mayoría de las interneuronas que cesan su descarga se localicen en el putamen. El hecho de que, según nuestro estudio, la densidad de neuronas colinérgicas en el núcleo caudado sea mucho mayor que en el putamen, induce a pensar que los procesos complejos que requieren la respuesta de las neuronas colinérgicas del núcleo caudado (Yamada et al., 2004), necesitan también un mayor número de interneuronas colinérgicas implicadas en su realización.

Además de su posición en el núcleo caudado o en el putamen, consideramos que la presencia de las interneuronas colinérgicas en la matriz o en los estriosomas puede ser de gran importancia a la hora de interpretar las posibles implicaciones funcionales de nuestro estudio. La acetilcolina actúa de dos formas distintas sobre las interneuronas gabaérgicas: las activa a través de receptores nicotínicos, más rápidos, pero que necesitan una mayor concentración de acetilcolina para activarse (Auerbach y Akk, 1998), y las inhibe a través de receptores muscarínicos (Koós y Tepper, 2002). Como se ha dicho anteriormente, los bajos niveles de acetilcolinesterasa en el interior de los estriosomas favorecen que haya una alta concentración de acetilcolina en el espacio sináptico. En una situación basal, sin estímulo, las interneuronas colinérgicas se encuentran descargando acetilcolina constantemente (Calabresi y cols., 2000a), por lo que los niveles tanto en la matriz como en los estriosomas, independientemente de la cantidad de acetilcolinesterasa en el medio, son suficientes para activar tanto a los receptores nicotínicos como a los muscarínicos de las interneuronas gabaérgicas y de las neuronas de proyección. Esto potencia la actuación de las interneuronas gabaérgicas,

que inhiben a las neuronas de proyección (Zhou y cols., 2002). Cuando se presenta un estímulo, se activan los receptores de NMDA de las interneuronas colinérgicas, lo cual produce una pausa en su descarga, y la consecuente disminución de los niveles de acetilcolina (Tepper y Bolam, 2004).

En la matriz, donde la acetilcolinesterasa es abundante, es probable que la cantidad de acetilcolina no sea suficiente para activar completamente a los receptores nicotínicos de las interneuronas gabaérgicas, por lo que se dificultará la conexión entre ellas y las neuronas de proyección, facilitando la excitación de las últimas. El efecto global de este proceso será la excitación talámica y cortical que dará lugar a la respuesta. En los estriosomas, por el contrario, el nivel de acetilcolinesterasa es muy bajo (Giménez-Amaya, 1993), y es probable que pese a la pausa de las TANs se conserve una cantidad suficiente de acetilcolina para activar los dos tipos de receptores de la interneuronas gabaérgicas, lo cual inhibiría a las neuronas de proyección y la excitación del tálamo y la corteza.

En definitiva, estos datos acerca de la funcionalidad de las interneuronas colinérgicas demuestran la importancia de su distribución selectiva a lo largo del estriado. Su prevalencia en el núcleo caudado con respecto al putamen, y en los territorios postcomisurales con respecto a los precomisurales, puede ser un claro hecho indicativo de que en estos territorios el control de las conexiones aferentes y eferentes del estriado requiere una especial regulación colinérgica. Además, la organización compartimental de estas interneuronas puede llegar a determinar el tipo de respuesta que va a seguir a un determinado estímulo, ya que la actuación de la acetilcolina depende de los distintos niveles de acetilcolinesterasa presentes en la matriz y en los estriosomas.

### ***5.5. Interneuronas estriatales calbindina positivas***

Estas interneuronas fueron descritas en el estriado humano en la década anterior (Kiyama y cols., 1990; Selden y cols., 1994b; Prensa y cols., 1998), y aún no han sido estudiadas en el mono. Por lo tanto, el grado de conocimiento que se tiene sobre ellas y sus posibles funciones en el estriado del primate es muy escaso. Su naturaleza gabaérgica no ha sido totalmente confirmada, aunque hay fundamentalmente dos hechos que permiten intuirlo. El primero es que entre el 20% y el 40% de las interneuronas calbindina positivas corresponden a interneuronas NADPH-diaforasa positivas y, por lo tanto, son gabaérgicas (Kawaguchi y cols., 1995). El segundo, que los otros dos grupos



de interneuronas con proteínas fijadoras de calcio que han sido encontrados en el estriado son gabaérgicos (interneuronas con calretinina y parvalbúmina) (Tepper y cols., 2004). Por lo tanto, en esta **Discusión** se asume la naturaleza gabaérgica de las interneuronas calbindina positivas, aunque este aspecto debería ser confirmado en futuros estudios.

Nuestros resultados demuestran que la distribución de las interneuronas calbindina positivas es heterogénea a lo largo del eje anteroposterior del estriado humano. Como se observó en los otros grupos de interneuronas estudiados, la densidad interneuronal es mayor en los territorios postcomisurales que en los precomisurales, aunque no aparecen diferencias evidentes entre el núcleo caudado y el putamen. Estas interneuronas ocupan especialmente el sector dorsomedial del núcleo caudado, y el dorsolateral del putamen. Con respecto a su organización compartimental, pese al escaso número de estas neuronas, aparecen en contacto con el compartimento estriosomal en todas las regiones del estriado.

La primera parte del estudio consistió en el análisis de la morfología de las interneuronas calbindina positivas. Como se ha dicho anteriormente, el grupo celular teñido intensamente con la técnica inmunohistoquímica de la calbindina fue considerado como un grupo de interneuronas debido a su morfología somatodendrítica, cuya característica principal era la ausencia de espinas (Prensa y cols., 1998), y que se diferencia claramente del otro grupo teñido débilmente, considerado como neuronas de proyección (Prensa y cols., 1998; Cicchetti y cols., 2000). Dentro del grupo de interneuronas, el marcaje de calbindina no era homogéneo, y aparecía mejor definido en aquéllas presentes en el putamen, principalmente en sus mitades dorsal y lateral. En cualquier caso, las interneuronas con un marcaje más difuso eran claramente distinguibles de las neuronas de proyección, ya que presentaban una mayor concentración de precipitado marrón y se apreciaban sus ramificaciones sin espinas dendríticas. De hecho, sólo se incluyeron en el estudio aquellas neuronas en las que se apreciaban dos o más dendritas primarias y las dendritas terciarias emergentes de, al menos, una de las prolongaciones secundarias.

Como en el caso de las interneuronas colinérgicas, la heterogeneidad morfológica de este grupo hizo imposible su clasificación en grupos independientes según su forma somatodendrítica, por lo que se analizó el tamaño de su soma en las distintas regiones estriatales con técnicas estereológicas. Como puede verse en los

gráficos de las Figuras 24 y 34, las diferencias entre las regiones fueron similares a las obtenidas en el estudio de las interneuronas colinérgicas, con algunas variaciones en los territorios precomisural y postcomisural de la cabeza y en el giro del núcleo caudado.

En el caso de las interneuronas calbindina positivas también se aprecia la relación negativa entre la densidad de una determinada región y el volumen del soma de las neuronas. Por ejemplo, el volumen disminuye al pasar de las regiones precomisurales a las postcomisurales tanto en el núcleo caudado como en el putamen, mientras que la densidad aumenta. Todas estas observaciones parecen confirmar las llevadas a cabo en las neuronas colinérgicas, y que sugieren la presencia de un mecanismo compensatorio por el cual la baja densidad de las interneuronas en una determinada región estriatal puede producir un aumento en su volumen. Es interesante señalar que las interneuronas calbindina positivas presentaban un volumen del soma mucho menor que las interneuronas colinérgicas, como era de esperar tras su análisis microscópico, y era similar al de las interneuronas nitrérgicas. Aunque previamente se había descrito una disminución del volumen del soma de las interneuronas calbindina positivas con la edad (Selden y cols., 1994b), el presente estudio no pudo confirmar esas variaciones.

El análisis de la distribución de las interneuronas calbindina positivas demostró la heterogeneidad con la que éstas aparecen en las distintas regiones del estriado humano. Como se ha dicho, existen pocos trabajos previos que hayan analizado la presencia de estas interneuronas en el hombre, y todos ellos coinciden en la abundancia de las interneuronas calbindina positivas en el putamen postcomisural, especialmente en su zona dorsolateral (Kiyama y cols., 1990; Selden y cols., 1994b; Prensa, 1998; Cicchetti y cols., 2000; Muiño y Prensa, 2004). Nuestro trabajo confirma estas observaciones, ya que el putamen postcomisural era una de las regiones más densamente pobladas por interneuronas calbindina positivas y donde quedaban más claramente teñidas. Además, el estudio estereológico reveló que la cabeza postcomisural y el cuerpo del núcleo caudado presentaban también una alta densidad de esta población de interneuronas, aunque el soma y el árbol dendrítico de las neuronas situadas en estas zonas no quedaran tan bien definidos.

La distribución de estas interneuronas fue, por lo tanto, similar a la de los dos grupos citados anteriormente, aunque con la gran diferencia de que la comparación entre el núcleo caudado y el putamen no ofreció resultados dispares ni en los territorios

precomisurales ni en los postcomisurales. La curva de distribución es parecida a la que siguieron las interneuronas nitrérgicas, aunque el descenso de la densidad en la cola del núcleo caudado no fue tan acusado. El giro del núcleo caudado presentó unos valores similares a los del cuerpo, demostrando que el descenso en la densidad de esta región es evidente en la población de interneuronas colinérgicas, pero no en la de nitrérgicas o en las neuronas calbindina positivas.

El hecho más destacado con respecto a la distribución del grupo de interneuronas calbindina positivas en el estriado es, por lo tanto, su presencia en las mitades dorsal y lateral del putamen postcomisural. Dado que esta región es considerada la zona sensorimotora por excelencia del estriado (Parent, 1990; Parent y Hazrati, 1995) y que, como se ha descrito recientemente, la zona dorsolateral parece activarse preferentemente en movimientos de los pies con un cierto solapamiento con aquéllos de las manos (Gerardin y cols., 2003), las interneuronas calbindina positivas podrían jugar un papel importante en la integración de este tipo de información, si bien es cierto que su densidad en las zonas posteriores del núcleo caudado, a las que se les atribuyen funciones asociativas, es también elevada.

En definitiva, las neuronas nitrérgicas parecen tener una mayor importancia en las regiones posteriores del núcleo caudado salvo en la cola; las colinérgicas, en los territorios postcomisurales de este mismo núcleo salvo en el giro; y, las calbindina positivas, en estas regiones posteriores y en el putamen postcomisural.

Con respecto a la organización compartimental de estas interneuronas, el presente estudio ha demostrado por primera vez que están en contacto con los estriosomas en toda la extensión del estriado humano. Dado el escaso número de estas células, su relación con los estriosomas no era tan llamativa como en el caso de las interneuronas nitrérgicas o colinérgicas. El número de neuronas que contactaba de cualquier manera con los estriosomas era muy bajo salvo en el putamen postcomisural. Además, de los estriosomas analizados, al menos el cincuenta por ciento de ellos aparecía desprovisto de interneuronas en las distintas regiones del estriado, salvo en el putamen precomisural. Aunque en una cantidad muy baja, estas neuronas aparecieron tanto en el centro como en la periferia estriosomal, y ocupaban el límite entre la matriz y los estriosomas más que aquél entre el centro y la periferia. La cabeza postcomisural del núcleo caudado fue el territorio en el que la relación entre las interneuronas y los estriosomas pareció ser menor.

Algunos de los estudios previos que habían mencionado a estas neuronas en la rata y en el hombre describieron haberlas encontrado tanto en la matriz como en los estriosomas (Bennett y Bolam, 1993; Selden y cols., 1994b; Prensa, 1998), lo cual supuso un hallazgo llamativo, ya que se pensaba que las neuronas de proyección marcadas con la técnica inmunohistoquímica de la calbindina estaban presentes únicamente en la matriz (Seto-Ohshima y cols., 1988; Selden y cols., 1994b). El presente estudio confirma la presencia de estas neuronas en el interior de los estriosomas, y además demuestra que esta característica se da en todas las regiones del estriado humano normal.

Debido al escaso número de interneuronas calbindina positivas en contacto con los estriosomas, es posible que la capacidad integradora de éstas entre ambos compartimentos estriatales sea reducida. Sería interesante observar la distribución compartimental de las otras interneuronas que expresan proteínas ligadoras de calcio (calretinina y parvalbúmina), y así poder concluir si estas tres poblaciones de interneuronas comparten ciertos rasgos en su distribución y en sus funciones. Según se ha descrito en trabajos recientes, las interneuronas calretinina positivas aparecen en los dos compartimentos estriatales, y tienden a ocupar los bordes entre la matriz y los estriosomas (Prensa y cols., 1998; 1999; Cicchetti y cols., 2000). Además, en estos trabajos se demuestra la presencia de las interneuronas parvalbúmina positivas tanto en la matriz como en los estriosomas. Otro trabajo interesante a llevar a cabo en un futuro sería observar la colocalización de las interneuronas calbindina positivas con las nitrérgicas en relación con el compartimento estriosomal, ya que es posible que el grado de colocalización sea distinto según la posición de las neuronas en los distintos compartimentos del estriado.

Con respecto a las características funcionales de las interneuronas calbindina positivas, su posible naturaleza gabaérgica las convertiría en un elemento más del complejo sistema inhibitorio intrínseco del estriado. En un principio se pensó que las neuronas de proyección tenían un árbol áxónico tan frondoso que les permitía inhibirse entre sí (Groves, 1983). Este modelo, que atribuiría a las interneuronas un papel mínimo en la organización del estriado, ha sido empleado en varios trabajos (Beiser y Houk, 1998; Bar-Gad y Bergman, 2001). Sin embargo, los completos estudios electrofisiológicos llevados a cabo por Jaeger y colaboradores (1994) demostraron que la inhibición que una neurona de proyección ejerce sobre las demás es muy pequeña o

inexistente, y que la regulación de la descarga de las neuronas de proyección es realizada esencialmente por las interneuronas [véase también el trabajo de Kita (1993) acerca de este tema].

Las interneuronas gabaérgicas estriatales más estudiadas han sido las parvalbúmina positivas. Sus características electrofisiológicas hacen que sean consideradas neuronas de descarga rápida (Kawaguchi, 1993). Este patrón de descarga produce potenciales postsinápticos inhibitorios en las neuronas de proyección (Tepper y cols., 2004). Además, estas interneuronas pueden descargar a modo de breves estallidos en los que se producen una gran cantidad de espigas, llegando de esta manera a anular completamente la actividad de las neuronas de proyección (Koós y Tepper, 1999). Se ha demostrado que el potencial postsináptico inhibitorio originado en las neuronas de proyección a causa de las interneuronas parvalbúmina positivas es mucho mayor que el producido por las colaterales de las propias neuronas de proyección (Koós y cols., 2004; Tepper y cols., 2004).

Aunque no existen datos sobre el patrón de descarga de las interneuronas calretinina positivas, Koós y Tepper (1999) encontraron en el estriado de la rata varios ejemplos de una interneurona cuya actividad electrofisiológica no había sido descrito anteriormente. Era similar al de las interneuronas nitrérgicas, y podía causar una inhibición total en la descarga de las neuronas de proyección. Debido a que esta población no ha sido químicamente caracterizada, es razonable pensar que pueda tratarse no sólo del patrón de descarga de las interneuronas calretinina positivas, sino también de las interneuronas calbindina positivas.

En cuanto a la conectividad de las interneuronas calbindina positivas, no se tienen datos acerca de sus conexiones aferentes o eferentes. En este sentido, las más conocidas son de nuevo las interneuronas parvalbúmina positivas, que parecen recibir proyecciones principalmente de la corteza cerebral (Kawaguchi y cols., 1995). De hecho, se ha comprobado que las terminales procedentes de regiones somatosensoriales y motoras de la corteza cerebral convergen en las interneuronas gabaérgicas con parvalbúmina, algo que no sucede en las neuronas de proyección (Ramanathan y cols., 2002). También reciben influencias gabaérgicas originadas en las colaterales axónicas de las neuronas de proyección, y están recíprocamente relacionadas con las interneuronas colinérgicas, como se ha explicado en el apartado anterior (Kawaguchi y

cols., 1995; Tepper y Bolam, 2004). Su principal diana son las neuronas de proyección (Kawaguchi y cols., 1995).

Pese al desconocimiento que se tiene acerca de las interneuronas calbindina positivas, su papel parece importante en la organización de las conexiones aferentes y eferentes del estriado humano, al formar parte probablemente de las interneuronas gabaérgicas. Como se explicará en el siguiente apartado, estas neuronas aparecen conservadas en la enfermedad de Huntington, mientras que las neuronas de proyección, también calbindina positivas, desaparecen en gran medida. Nuestro trabajo demuestra que la distribución de estas interneuronas es heterogénea en el estriado humano en los ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral, y que tienen unas características que no son compartidas por los principales grupos de interneuronas estriatales, como es su abundancia en ciertas regiones del putamen postcomisural. Estos hallazgos hacen que las interneuronas calbindina positivas puedan ser un interesante foco de interés en futuros estudios, tanto en animales como en el ser humano.

#### ***5.6. El papel de las interneuronas estriatales en el conjunto de los ganglios basales y su implicación en procesos patológicos***

El último capítulo de esta **Discusión** tiene como objetivo poner de manifiesto las implicaciones funcionales que conlleva el presente estudio, ya que las interneuronas estriatales suponen un elemento fundamental en la integración de la información que fluye a través de los ganglios basales. Además, los grupos neuronales que se han tratado en este trabajo coordinan procesos neurobiológicos normales, como la plasticidad sináptica, y también se implican en distintas patologías que afectan a las funciones cognitivas, emocionales y motoras del ser humano.

Como se ha explicado en la **Introducción**, el modelo que ha tenido más éxito para comprender el flujo de la información a través de los ganglios basales es el que propusieron Alexander y colaboradores en 1986. Según estos autores, distintas áreas de la corteza cerebral que procesan el mismo tipo de información proyectan a una zona determinada del estriado, que a su vez envía sus axones a los núcleos de salida de los ganglios basales, los cuales conectan con el tálamo, y éste acaba proyectando a regiones de la corteza cerebral de la misma naturaleza que aquéllas en las que había comenzado todo el circuito corticosubcortical. Según estos autores, existirían al menos cinco circuitos distintos: motor, oculomotor, dorsolateral prefrontal, lateral orbitofrontal y

cingulado anterior. Para cada uno de ellos, los axones corticoestriatales procedentes de las distintas regiones corticales funcionalmente relacionadas terminarían en territorios segregados con un pequeño solapamiento. Sin embargo, en los núcleos de salida de los ganglios basales y en el tálamo el grado de solapamiento sería mayor y los dominios corticales acabarían convergiendo (Alexander y cols., 1986).

Estos mismos autores reconocen que la integración entre los distintos circuitos ha de ser imprescindible para un correcto funcionamiento de los ganglios basales. En un trabajo reciente, Haber (2003) revisa este modelo e incide en la importancia de entender el flujo de información a través de los ganglios basales no como un conjunto de circuitos paralelos independientes, sino como una integración entre distintos canales que atraviesan los ganglios basales de un modo topográficamente organizado. Según esta investigadora, la capacidad de adaptación de los ganglios basales para llevar a cabo procesos en los que la decisión y el aprendizaje son fundamentales requiere una integración total entre los distintos circuitos “paralelos” en los que la información cortical pueda segregarse a través de los ganglios basales. Una interrupción en la comunicación de estos canales puede ser la consecuencia de aquellos procesos patológicos que afectan a los ganglios basales y alteran las funciones motoras, cognitivas y emocionales en el hombre. Basándose en datos anatómicos, Haber sugiere que la integración entre los distintos circuitos podría darse a tres niveles distintos: 1) por medio de las fibras corticoestriatales, ya que, aunque terminen en un campo estriatal determinado, sus axones y dendritas cruzan territorios funcionalmente distintos [véase el trabajo de Francois y colaboradores (1994) como un ejemplo a este respecto]; 2) a través de la convergencia de terminales procedentes de campos corticales adyacentes funcionalmente relacionados en los ganglios basales (Yelnik y cols., 1997); y 3) por medio de complejas conexiones no recíprocas entre diversas estructuras subcorticales, como por ejemplo, el modo en que el estriado ventral podría influir sobre el estriado dorsal a través de las proyecciones dopaminérgicas desde el mesencéfalo (Somogyi y cols., 1981).

Además de esta integración entre los distintos circuitos, llevada a cabo en el estriado pero en la que participan otros núcleos, habría que incluir un cuarto punto, que es la capacidad de las interneuronas estriatales para recoger e integrar la información procedente de regiones corticales y talámicas funcionalmente distintas (Kawaguchi y cols., 1995; Kawaguchi, 1997; Centonze y cols., 1999; Saka y cols., 2002; Tepper y

Bolam, 2004). Teniendo esto en cuenta, las interneuronas estriatales podrían representar uno de los factores reguladores y responsables de la organización de la información en el estriado y, por lo tanto, en los ganglios basales y en sus estructuras relacionadas. Así, se ha visto que las interneuronas estriatales están implicadas en el aprendizaje y en la plasticidad de la respuesta estriatal (Centonze y cols., 1999; Calabresi y cols., 2000b; Calabresi y cols., 2000a; Pisani y cols., 2001), y se ha comprobado su alteración numérica, morfológica o funcional en procesos patológicos que afectan a actividades motoras, cognitivas o emocionales (Holt y cols., 1999; Saka y cols., 2002; Cannizzaro y cols., 2003; Pisani y cols., 2003; Saka y Graybiel, 2003; Holt y cols., 2005; Lauer y cols., 2005). Por lo tanto, pensamos que las interneuronas estriatales podrían jugar un importante papel en la integración de la información que fluye a través de los ganglios basales.

Como se ha mencionado anteriormente, un claro ejemplo en el que se pone de manifiesto la importancia de las interneuronas estriatales en el flujo de la información a través de los ganglios basales es la plasticidad sináptica. En el estriado de los mamíferos, hay áreas relacionadas con la memoria en las que ciertos patrones de actividad sináptica se traducen en cambios duraderos en la eficacia de la transmisión nerviosa (Centonze y cols., 1999). En concreto, la plasticidad sináptica en el estriado aparece por la estimulación de los axones corticales sobre las neuronas estriatales, y tiene dos manifestaciones distintas: la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*), y la depresión a largo plazo (LTD, del inglés *long term depression*). Estos eventos no sólo se relacionan con la memoria, sino también con los movimientos repetidos y la adquisición de hábitos (Centonze y cols., 1999). Según sea la actividad de los axones corticoestriatales, se inducirá una u otra. En general, se ha visto que una estimulación intensa y repetitiva aumenta la concentración de calcio en la neurona estriatal, activándose ciertas enzimas y produciendo LTP. Sin embargo, una estimulación más moderada produce un aumento menor del calcio intracelular, activándose otros complejos enzimáticos y produciendo LTD (Bear y Malenka, 1994; Calabresi y cols., 2000a).

En el estriado, la plasticidad sináptica se manifiesta en las neuronas de proyección. Según se ha observado, la LTP requiere un aumento de calcio mediado por la activación de receptores de NMDA, al contrario que la LTD. Sin embargo, aunque las neuronas de proyección sean el objetivo final de la plasticidad sináptica estriatal, y sus



efectos se pongan de manifiesto en las conexiones eferentes estriatales, es necesario tener en cuenta el papel fundamental de las interneuronas estriatales a la hora de permitir que la plasticidad sináptica se manifieste como LTP o LTD (Centonze y cols., 1999).

Según es sabido hasta el momento, las interneuronas nitrérgicas son imprescindibles para la generación de LTD, mientras que las colinérgicas lo son para la LTP. Una estimulación de alta frecuencia de las proyecciones corticoestriatales hace que las interneuronas nitrérgicas sinteticen y liberen óxido nítrico. Éste penetra en la neurona de proyección, uniéndose a la guanilato ciclasa soluble, y produciendo la activación de la proteinquinasa G, que fosforila a los receptores de AMPA de la membrana plasmática y los hace insensibles al glutamato liberado por las terminales corticoestriatales (Centonze y cols., 1999). Por lo tanto, las interneuronas nitrérgicas reducen la sensibilidad de las neuronas de proyección al glutamato cortical, produciendo la LTD. Por otra parte, la acetilcolina liberada por las interneuronas colinérgicas se une a receptores del tipo  $M_1$  de las neuronas de proyección, desencadenando una serie de reacciones que producen la activación de la proteinquinasa C, que fosforila a los receptores de NMDA de la membrana y los activa (Calabresi y cols., 2000a). En definitiva, las interneuronas colinérgicas facilitan la capacidad de las neuronas de proyección a responder a estímulos corticales, produciendo la LTP. Recientemente, se ha comprobado que tanto la LTP como la LTD pueden darse en la misma neurona de proyección, que puede alternar entre uno y otro proceso según la información que reciba (Fino y cols., 2005). Aún no ha sido probada la actividad de las interneuronas gabaérgicas en la formación de los procesos relacionados con la plasticidad sináptica, pero la relación morfofuncional entre los tres tipos de interneuronas estriatales hace suponer que todas ellas participan de algún modo implicadas en estos eventos (Kawaguchi y cols., 1995; Zhou y cols., 2002; Tepper y Bolam, 2004).

El estriado parece estar implicado en numerosos trastornos neurológicos y psiquiátricos, entre los que se encuentran las enfermedades de Parkinson y de Huntington, el síndrome de Tourette, y la esquizofrenia. En síntesis, en la primera aparece una disminución de la innervación dopaminérgica estriatal (Hornykiewicz, 1975); en la segunda degenera un tipo de neuronas de proyección del estriado (Cicchetti y cols., 2000); en la tercera se da una elevada expresión de dopamina que afecta especialmente a los estriosomas (Saka y Graybiel, 2003); y, por el momento, se han

detectado alteraciones tanto en la morfología como en la distribución de algunas poblaciones de neuronas estriatales en la cuarta (Holt y cols., 1999; Lauer y cols., 2005). De hecho, en todas estas enfermedades se ha visto una particular implicación de las interneuronas del estriado. En algunos modelos animales que simulan la enfermedad de Parkinson parece aumentar el número de las interneuronas dopaminérgicas (Betarbet y cols., 1997); en la enfermedad de Huntington las interneuronas parecen estar protegidas con respecto a las neuronas de proyección (Cicchetti y cols., 2000); las interneuronas parecen determinar la activación de genes de expresión temprana en la matriz o en los estriosomas según la inervación dopaminérgica que reciban (Saka y cols., 2002; Saka y Graybiel, 2003); y las alteraciones cualitativas y cuantitativas en las neuronas estriatales que se dan en la esquizofrenia han sido encontradas por el momento en las interneuronas (Holt y cols., 1999; Holt y cols., 2005; Lauer y cols., 2005).

Relacionando los resultados del presente estudio con los hechos que se han mencionado en este apartado, la mayor densidad interneuronal en el núcleo caudado con respecto al putamen podría implicar la existencia de un mayor número de circuitos funcionales en este núcleo estriatal, algo que requeriría una mayor presencia de interneuronas para conseguir altos niveles de integración nerviosa de diversos tipos. Esto mismo se daría también en el estriado posterior con respecto al anterior. El grado de diversidad de las proyecciones corticoestriatales en una determinada región del estriado puede condicionar la presencia de un mayor número de interneuronas que integren la información de las distintas regiones corticales. Por lo tanto, la abundancia de interneuronas en un determinado territorio estriatal indicaría una gran variedad de proyecciones corticales en esa región.

Asimismo, la distribución selectiva de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas en el estriado humano puede indicar una heterogeneidad de la plasticidad sináptica a lo largo de todo el territorio estriatal. Hemos visto que en las regiones postcomisurales del núcleo caudado, salvo en su giro, las dos poblaciones de interneuronas eran especialmente abundantes. Este hecho denotaría una mayor importancia de la plasticidad sináptica, es decir, de procesos relacionados con la memoria y la obtención de hábitos, en estas regiones del estriado. En el giro del núcleo caudado, sin embargo, la abundancia de las interneuronas nitrérgicas y la escasez de las colinérgicas podría indicar una mayor importancia de la LTD sobre la LTP.

Por último, la presencia de las interneuronas estriatales en distintas enfermedades mentales puede ser un hecho clave a la hora de comprender los procesos fisiopatológicos de estas alteraciones. Como se ha visto, la respuesta de las interneuronas ante distintos tipos de enfermedades no es siempre la misma, ya que en algunas ocasiones aparecen aumentadas, y en otras disminuidas. El grado de conocimiento que alcancemos acerca de la distribución de las interneuronas estriatales en el cerebro humano normal y patológico, así como su relación con respecto al compartimento estriosomal, puede ser un factor muy importante a la hora de interpretar el papel que juega el estriado en el conjunto de los ganglios basales y en las relaciones corticosubcorticales, y su implicación en procesos patológicos neurodegenerativos y psiquiátricos.



## ***6. CONCLUSIONES***



Las tres poblaciones de interneuronas estriatales seleccionadas en el presente estudio se visualizaron con la técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa, y las inmunohistoquímicas de la colina acetiltransferasa y de la calbindina. Su morfología fue analizada con el microscopio óptico, y el volumen de su soma fue medido con técnicas estereológicas. También se aplicó la metodología estereológica para analizar la distribución de las tres poblaciones neuronales en las distintas regiones y sectores en los que se dividió el estriado humano. Por último, se analizó la posición de estas interneuronas con respecto a la compartimentación estriatal, empleando técnicas de doble marcaje en la misma preparación o en cortes adyacentes procesados con técnicas distintas.

Las conclusiones que se derivan del presente estudio son las siguientes:

- 1) La parte posterior del estriado humano tiene características químicas similares a las de la porción anterior, y otras que son exclusivas de este territorio estriatal. Además de contener estriosomas, que suelen ser de pequeño tamaño y homogéneos en su constitución química, algunas de las proteínas empleadas como marcadores tisulares tienen una distribución heterogénea a modo de gradiente o se acumulan en zonas estriatales concretas. La cola del núcleo caudado es la única región del estriado en la que no se encontraron estriosomas.
- 2) Las interneuronas nitrérgicas se dividen en tres grupos morfológicos distintos en atención a sus características somatodendríticas, mientras que las interneuronas colinérgicas y calbindina positivas muestran tal variedad morfológica que no es posible realizar una sistematización de sus diferentes subtipos. En general, parece haber un mecanismo compensatorio por el cual en aquellas regiones estriatales en las que la densidad neuronal es mayor, el soma de las interneuronas es más pequeño.
- 3) Las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas son más abundantes en el núcleo caudado que en el putamen, tanto en los territorios precomisurales como en los postcomisurales. Sin embargo, las interneuronas calbindina positivas presentan valores similares en ambas estructuras estriatales, llegando la densidad del putamen incluso a superar a la del núcleo caudado en algunos territorios postcomisurales.

- 4) Las tres poblaciones de interneuronas incluidas en este estudio tienen una distribución heterogénea en el eje anteroposterior. Todas ellas mostraron una mayor densidad en los territorios postcomisurales que en los precomisurales, tanto en el núcleo caudado como en el putamen.
- 5) Las interneuronas estriatales analizadas tienen también una distribución heterogénea en los ejes dorsoventral y mediolateral. El sector dorsomedial del núcleo caudado y el dorsolateral del putamen son los que presentan una mayor densidad interneuronal, aunque las interneuronas nitrérgicas son también abundantes en la mitad ventral del putamen postcomisural.
- 6) Los tres grupos de interneuronas aparecen en contacto con los estriosomas en todas las regiones del estriado, pudiendo ocupar el centro y la periferia de los estriosomas, y los límites entre los distintos compartimentos. La excepción a esta conclusión la representan las interneuronas colinérgicas en el giro del núcleo caudado, donde no aparecen en contacto con los estriosomas.
- 7) El patrón de la organización compartimental de estas interneuronas es heterogéneo en las distintas regiones del estriado humano. En general, el núcleo caudado precomisural y el putamen postcomisural son los territorios con una mayor variedad en la organización compartimental de las interneuronas, y con un mayor número de ellas en contacto con los estriosomas.
- 8) Los datos expuestos en el presente trabajo demuestran que el estriado humano no puede ser considerado como una estructura homogénea, ya que su composición celular es distinta en el núcleo caudado y en el putamen a lo largo de sus ejes anteroposterior, dorsoventral y mediolateral.



## ***7. ABREVIACIONES***



En este trabajo se ha tratado de reducir el empleo de abreviaciones en la *Introducción*, la *Discusión* y las *Conclusiones* para facilitar su lectura. Por ello, en estas secciones sólo se encuentran algunos acrónimos y siglas. Las abreviaciones introducidas en el apartado *Planteamiento y Objetivos* son válidas para el *Material y Métodos* y los *Resultados*. En cuanto a las abreviaciones presentes en las *Figuras*, son citadas en el pie correspondiente. Como puede observarse, en el texto de cada pie se han utilizado las abreviaciones que estaban citadas en la Figura correspondiente, exceptuando los acortamientos. Los símbolos científicos convencionales ( $\mu\text{m}$  o  $\text{mm}^3$ , por ejemplo) no han sido incluidos en esta lista.

<b>ABC</b>	Complejos avidina-biotina-peroxidasa
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>B</b>	Bipolar
<b>ca</b>	Comisura anterior
<b>CB</b>	Calbindina
<b>ChAT</b>	Colina acetiltransferasa
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>dl</b>	Dorsolateral
<b>dm</b>	Dorsomedial
<b>ENK</b>	Encefalina
<b>estr.</b>	Estriosoma
<b>F</b>	Femenino
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Agua oxigenada
<b>LAMP</b>	Proteína de membrana asociada al sistema límbico
<b>LTD</b>	Depresión a largo plazo
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>M</b>	Masculino

---

<b>n</b>	Número de casos
<b>NADPH-d</b>	NADPH-diaforasa
<b>NC</b>	Núcleo caudado
<b>NeuN</b>	Proteína nuclear neuronal
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>O</b>	Ovoide
<b>perif.</b>	Periferia
<b>postcom.</b>	Postcomisural
<b>precom.</b>	Precomisural
<b>Put</b>	Putamen
<b>PV</b>	Parvalbúmina
<b>pv</b>	Posteroventral
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SOM</b>	Somatostatina
<b>T</b>	Triangular
<b>TANs</b>	Neuronas tónicamente activas
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa
<b>vl</b>	Ventrolateral
<b>vm</b>	Ventromedial

## ***8. BIBLIOGRAFÍA***



- Aizman, O., H. Brismar, P. Uhlen, E. Zettergren, A. I. Levey, H. Forssberg, P. Greengard y A. Aperia (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3(3): 226-230.
- Alcántara, A. A., L. Mrzljak, R. L. Jakab, A. I. Levey, S. M. Hersch y P. S. Goldman-Rakic (2001) Muscarinic m1 and m2 receptor proteins in local circuit and projection neurons of the primate striatum: anatomical evidence for cholinergic modulation of glutamatergic prefronto-striatal pathways. *J Comp Neurol* 434(4): 445-460.
- Alexander, G. E. y M. R. DeLong (1985) Microstimulation of the primate neostriatum. II. Somatotopic organization of striatal microexcitable zones and their relation to neuronal response properties. *J Neurophysiol* 53(6): 1417-1430.
- Alexander, G. E. y M. D. Crutcher (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13(7): 266-271.
- Alexander, G. E., M. R. DeLong y P. L. Strick (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9: 357-381.
- Alheid, G. F. y L. Heimer (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27(1): 1-39.
- Ambani, L. M. y M. H. Van Woert (1973) Catalase and peroxidase in human brain. *Trans Am Neurol Assoc* 98: 7-10.
- Anderson, K. D. y A. Reiner (1991) Striatonigral projection neurons: a retrograde labeling study of the percentages that contain substance P or enkephalin in pigeons. *J Comp Neurol* 303(4): 658-673.
- Aoki, C. y V. M. Pickel (1988) Neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum: ultrastructure and cellular relations with tyrosine hydroxylase- containing terminals and with astrocytes. *Brain Res* 459(2): 205-225.
- Aosaki, T., A. M. Graybiel y M. Kimura (1994a) Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science* 265(5170): 412-415.

- Aosaki, T., M. Kimura y A. M. Graybiel (1995) Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum. *J Neurophysiol* 73(3): 1234-1252.
- Aosaki, T., H. Tsubokawa, A. Ishida, K. Watanabe, A. M. Graybiel y M. Kimura (1994b) Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J Neurosci* 14(6): 3969-3984.
- Apicella, P. (2002) Tonically active neurons in the primate striatum and their role in the processing of information about motivationally relevant events. *Eur J Neurosci* 16(11): 2017-2026.
- Arikuni, T. y K. Kubota (1986) The organization of prefrontocaudate projections and their laminar origin in the macaque monkey: a retrograde study using HRP-gel. *J Comp Neurol* 244(4): 492-510.
- Auerbach, A. y G. Akk (1998) Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism. *J Gen Physiol* 112(2): 181-197.
- Avendaño, C., S. de Las Heras y J. M. Giménez-Amaya (2005a) Striatal projections from the lateral and posterior thalamic complexes. An anterograde tracer study in the cat. *Histochem Cell Biol*: 1-7.
- Avendaño, C., R. Machin, P. E. Bermejo y A. Lagares (2005b) Neuron numbers in the sensory trigeminal nuclei of the rat: A GABA- and glycine-immunocytochemical and stereological analysis. *J Comp Neurol* 493(4): 538-553.
- Bar-Gad, I. y H. Bergman (2001) Stepping out of the box: information processing in the neural networks of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 11(6): 689-695.
- Beal, M. F., R. C. Frank, D. W. Ellison y J. B. Martin (1986) The effect of neuropeptide Y on striatal catecholamines. *Neurosci Lett* 71(1): 118-123.
- Bear, M. F. y R. C. Malenka (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 4(3): 389-399.
- Beckstead, R. M. (1984) The thalamostriatal projection in the cat. *J Comp Neurol* 223(3): 313-346.
- Beckstead, R. M. y K. S. Kersey (1985) Immunohistochemical demonstration of differential substance P-, met-enkephalin-, and glutamic-acid-decarboxylase-



- containing cell body and axon distributions in the corpus striatum of the cat. *J Comp Neurol* 232(4): 481-498.
- Beiser, D. G. y J. C. Houk (1998) Model of cortical-basal ganglionic processing: encoding the serial order of sensory events. *J Neurophysiol* 79(6): 3168-3188.
- Benke, T., M. Delazer, L. Bartha y A. Auer (2003) Basal ganglia lesions and the theory of fronto-subcortical loops: neuropsychological findings in two patients with left caudate lesions. *Neurocase* 9(1): 70-85.
- Bennett, B. D. y J. P. Bolam (1993) Two populations of calbindin D28k-immunoreactive neurones in the striatum of the rat. *Brain Res* 610(2): 305-310.
- Bennett, B. D., J. C. Callaway y C. J. Wilson (2000) Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20(22): 8493-8503.
- Berendse, H. W., Y. Galis-de Graaf y H. J. Groenewegen (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol* 316(3): 314-347.
- Bernácer, J., L. Prensa y J. M. Giménez-Amaya (2005) Morphological features, distribution and compartmental organization of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced-diaphorase interneurons in the human striatum. *J Comp Neurol* 489(3): 311-327.
- Besson, M. J., A. M. Graybiel y B. Quinn (1990) Co-expression of neuropeptides in the cat's striatum: an immunohistochemical study of substance P, dynorphin B and enkephalin. *Neuroscience* 39(1): 33-58.
- Betarbet, R., R. Turner, V. Chockkan, M. R. DeLong, K. A. Allers, J. Walters, A. I. Levey y J. T. Greenamyre (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci* 17(17): 6761-6768.
- Bird, E. D., E. G. Spokes y L. L. Iversen (1979) Increased dopamine concentration in limbic areas of brain from patients dying with schizophrenia. *Brain* 102(2): 347-360.
- Bjugn, R. y H. J. Gundersen (1993) Estimate of the total number of neurons and glial and endothelial cells in the rat spinal cord by means of the optical disector. *J Comp Neurol* 328(3): 406-414.
- Blanchet, F., M. L. Kemel, C. Gauchy, M. Desban, S. Pérez y J. Glowinski (1997) N-methyl-D-aspartate-evoked release of [3H]acetylcholine in striatal compartments

- of the rat: regulatory roles of dopamine and GABA. *Neuroscience* 81(1): 113-127.
- Bolam, J. P., P. N. Izzo y A. M. Graybiel (1988) Cellular substrate of the histochemically defined striosome/matrix system of the caudate nucleus: a combined Golgi and immunocytochemical study in cat and ferret. *Neuroscience* 24(3): 853-875.
- Bolam, J. P., P. Somogyi, H. Takagi, I. Fodor y A. D. Smith (1983) Localization of substance P-like immunoreactivity in neurons and nerve terminals in the neostriatum of the rat: a correlated light and electron microscopic study. *J Neurocytol* 12(2): 325-344.
- Bouyer, J. J., D. H. Park, T. H. Joh y V. M. Pickel (1984) Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. *Brain Res* 302(2): 267-275.
- Boysen, M. y A. Reith (1984) Light- and electron-microscopic studies by manual and semiautomatic morphometric analysis of the basal cell layer. Objective discrimination of pseudostratified, metaplastic and dysplastic nasal epithelium. *Methods Achiev Exp Pathol* 11: 111-137.
- Braak, H. y E. Braak (1982) Neuronal types in the striatum of man. *Cell Tissue Res* 227(2): 319-342.
- Bracci, E. y S. Panzeri (2005) Excitatory GABAergic Effects in Striatal Projection Neurons. *J Neurophysiol*.
- Brauer, K., M. Hausser, W. Hartig y T. Arendt (2000) The core-shell dichotomy of nucleus accumbens in the rhesus monkey as revealed by double-immunofluorescence and morphology of cholinergic interneurons. *Brain Res* 858(1): 151-162.
- Bredt, D. S. y S. H. Snyder (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8(1): 3-11.
- Brenman, J. E. y D. S. Bredt (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol* 7(3): 374-378.
- Burke, R. E. y A. L. Karanas (1990) Demonstration of a medial to lateral gradient in the density of cholinergic neuropil in the rat striatum. *Neurosci Lett* 108(1-2): 58-64.

- Butcher, L. L. y G. K. Hodge (1976) Postnatal development of acetylcholinesterase in the caudate-putamen nucleus and substantia nigra of rats. *Brain Res* 106(2): 223-240.
- Calabresi, P., A. Pisani, N. B. Mercuri y G. Bernardi (1996) The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 19(1): 19-24.
- Calabresi, P., D. Centonze, P. Gubellini, A. Pisani y G. Bernardi (2000a) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23(3): 120-126.
- Calabresi, P., D. Centonze, P. Gubellini, G. A. Marfia, A. Pisani, G. Sancesario y G. Bernardi (2000b) Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 61(3): 231-265.
- Cannizzaro, C., B. C. Tel, S. Rose, B. Y. Zeng y P. Jenner (2003) Increased neuropeptide Y mRNA expression in striatum in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 110(2): 169-176.
- Cavada, C. y P. S. Goldman-Rakic (1991) Topographic segregation of corticostriatal projections from posterior parietal subdivisions in the macaque monkey. *Neuroscience* 42(3): 683-696.
- Cebrián, C., A. Parent y L. Prensa (2005) Patterns of axonal branching of neurons of the substantia nigra pars reticulata and pars lateralis in the rat. *J Comp Neurol* 492(3): 349-369.
- Celio, M. R. (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35(2): 375-475.
- Celio, M. R., W. Baier, L. Scharer, P. A. de Viragh y C. Gerday (1988) Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein parvalbumin. *Cell Calcium* 9(2): 81-86.
- Centonze, D., P. Gubellini, G. Bernardi y P. Calabresi (1999) Permissive role of interneurons in corticostriatal synaptic plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 31(1): 1-5.
- Centonze, D., A. Pisani, P. Bonsi, P. Giacomini, G. Bernardi y P. Calabresi (2001) Stimulation of nitric oxide-cGMP pathway excites striatal cholinergic interneurons via protein kinase G activation. *J Neurosci* 21(4): 1393-1400.
- Centonze, D., C. Grande, E. Saulle, A. B. Martin, P. Gubellini, N. Pavon, A. Pisani, G. Bernardi, R. Moratalla y P. Calabresi (2003a) Distinct roles of D1 and D5

- dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci* 23(24): 8506-8512.
- Centonze, D., C. Grande, A. Usiello, P. Gubellini, E. Erbs, A. B. Martin, A. Pisani, N. Tognazzi, G. Bernardi, R. Moratalla, E. Borrelli y P. Calabresi (2003b) Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *J Neurosci* 23(15): 6245-6254.
- Cerasa, A., G. E. Hagberg, M. Bianciardi y U. Sabatini (2005) Visually cued motor synchronization: modulation of fMRI activation patterns by baseline condition. *Neurosci Lett* 373(1): 32-37.
- Chang, H. T. (1988) Dopamine-acetylcholine interaction in the rat striatum: a dual-labeling immunocytochemical study. *Brain Res Bull* 21(2): 295-304.
- Chesselet, M. F. y A. M. Graybiel (1986) Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence for a peptidergic interneuronal system in the cat. *Neuroscience* 17(3): 547-571.
- Chesselet, M. F. y E. Robbins (1989) Characterization of striatal neurons expressing high levels of glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Brain Res* 492(1-2): 237-244.
- Chesselet, M. F., C. Gonzales y P. Levitt (1991) Heterogeneous distribution of the limbic system-associated membrane protein in the caudate nucleus and substantia nigra of the cat. *Neuroscience* 40(3): 725-733.
- Chesselet, M. F., J. J. Soghomonian y P. Salin (1995) Anatomical localization and regulation of somatostatin gene expression in the basal ganglia and its clinical implications. *Ciba Found Symp* 190: 51-59; discussion 59-64.
- Chiken, S., N. Hatanaka y H. Tokuno (2003) Cytochrome oxidase activity in the monkey globus pallidus and subthalamic nucleus after ablation of striatal interneurons expressing substance P receptors. *Neurosci Lett* 353(2): 103-106.
- Cicchetti, F., T. G. Beach y A. Parent (1998) Chemical phenotype of calretinin interneurons in the human striatum. *Synapse* 30(3): 284-297.
- Cicchetti, F., L. Prensa, Y. Wu y A. Parent (2000) Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 34(1-2): 80-101.

- Cossette, M., D. Lévesque y A. Parent (2005) Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum. *Parkinsonism Relat Disord* 11(5): 277-286.
- Côté, P. Y., P. Levitt y A. Parent (1995) Distribution of limbic system-associated membrane protein immunoreactivity in primate basal ganglia. *Neuroscience* 69(1): 71-81.
- Cowan, R. L., C. J. Wilson, P. C. Emson y C. W. Heizmann (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 302(2): 197-205.
- Cragg, S. J. (2006) Meaningful silences: how dopamine listens to the ACh pause. *Trends Neurosci* 29(3): 125-131.
- Cross, A. J. y F. Owen (1979) The activities of glutamic acid decarboxylase and choline acetyltransferase in post-mortem brains of schizophrenics and controls [proceedings]. *Biochem Soc Trans* 7(1): 145-146.
- Dawbarn, D., S. P. Hunt y P. C. Emson (1984) Neuropeptide Y: regional distribution chromatographic characterization and immunohistochemical demonstration in post-mortem human brain. *Brain Res* 296(1): 168-173.
- Dawson, T. M., D. S. Bredt, M. Fotuhi, P. M. Hwang y S. H. Snyder (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17): 7797-7801.
- de la Mothe, L. A., S. Blumell, Y. Kajikawa y T. A. Hackett (2006) Cortical connections of the auditory cortex in marmoset monkeys: Core and medial belt regions. *J Comp Neurol* 496(1): 27-71.
- de las Heras, S. (1997) Estudio anatómico de las proyecciones talamoestriadas al núcleo caudado y de sus relaciones con las conexiones nigrotalámicas en el gato adulto, Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- de las Heras, S., E. Mengual y J. M. Giménez-Amaya (1998a) Overlapping territories between the thalamostriatal and nigrothalamic projections in cats. *Neuroreport* 9(8): 1913-1916.
- de las Heras, S., E. Mengual y J. M. Giménez-Amaya (1999) Double retrograde tracer study of the thalamostriatal projections to the cat caudate nucleus. *Synapse* 32(2): 80-92.

- de las Heras, S., E. Mengual, J. L. Velayos y J. M. Giménez-Amaya (1997) New data on the anatomical organization of the thalamostriatal projections. *Adv Neurol* 74: 69-81.
- de las Heras, S., E. Mengual, J. L. Velayos y J. M. Giménez-Amaya (1998b) Re-examination of topographic distribution of thalamic neurons projecting to the caudate nucleus. A retrograde labeling study in the cat. *Neurosci Res* 31(4): 283-293.
- de Olmos, J. S. y L. Heimer (1999) The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci* 877: 1-32.
- DeLong, M. R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13(7): 281-285.
- DiFiglia, M. (1987) Synaptic organization of cholinergic neurons in the monkey neostriatum. *J Comp Neurol* 255(2): 245-258.
- DiFiglia, M., P. Pasik y T. Pasik (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* 114(2): 245-256.
- DiFiglia, M., S. Christakos y N. Aronin (1989) Ultrastructural localization of immunoreactive calbindin-D28k in the rat and monkey basal ganglia, including subcellular distribution with colloidal gold labeling. *J Comp Neurol* 279(4): 653-665.
- Eblen, F. y A. M. Graybiel (1995) Highly restricted origin of prefrontal cortical inputs to striosomes in the macaque monkey. *J Neurosci* 15(9): 5999-6013.
- Erro, E. M., J. L. Lanciego y J. M. Giménez-Amaya (2002) Re-examination of the thalamostriatal projections in the rat with retrograde tracers. *Neurosci Res* 42(1): 45-55.
- Eve, D. J., A. P. Nisbet, A. E. Kingsbury, J. Temlett, C. D. Marsden y O. J. Foster (1997) Selective increase in somatostatin mRNA expression in human basal ganglia in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 50(1-2): 59-70.
- Feneis, H. y W. Dauber (2003) *Nomenclatura anatómica ilustrada*. Barcelona, Masson.
- Fernandez-Ruiz, J., J. Wang, T. G. Aigner y M. Mishkin (2001) Visual habit formation in monkeys with neurotoxic lesions of the ventrocaudal neostriatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7): 4196-4201.

- Ferrante, R. J., N. W. Kowall, M. F. Beal, J. B. Martin, E. D. Bird y E. P. Richardson, Jr. (1987) Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46(1): 12-27.
- Fino, E., J. Glowinski y L. Venance (2005) Bidirectional activity-dependent plasticity at corticostriatal synapses. *J Neurosci* 25(49): 11279-11287.
- Fisher, R. S., C. Shiota, M. S. Levine, C. D. Hull y N. A. Buchwald (1984) Interhemispheric organization of corticocaudate projections in the cat: a retrograde double-labelling study. *Neurosci Lett* 48(3): 369-373.
- Flaherty, A. W. y A. M. Graybiel (1993) Two input systems for body representations in the primate striatal matrix: experimental evidence in the squirrel monkey. *J Neurosci* 13(3): 1120-1137.
- Flaherty, A. W. y A. M. Graybiel (1994) Input-output organization of the sensorimotor striatum in the squirrel monkey. *J Neurosci* 14(2): 599-610.
- Fox, C. A., A. N. Andrade, R. C. Schwyn y J. A. Rafols (1971a) The aspiny neurons and the glia in the primate striatum: a golgi and electron microscopic study. *J Hirnforsch* 13(4): 341-362.
- Fox, C. A., A. N. Andrade, D. E. Hillman y R. C. Schwyn (1971b) The spiny neurons in the primate striatum: a Golgi and electron microscopic study. *J Hirnforsch* 13(3): 181-201.
- Francois, C., J. Yelnik, G. Percheron y G. Fenelon (1994) Topographic distribution of the axonal endings from the sensorimotor and associative striatum in the macaque pallidum and substantia nigra. *Exp Brain Res* 102(2): 305-318.
- Freund, T. F., J. F. Powell y A. D. Smith (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13(4): 1189-1215.
- Fudge, J. L. y S. N. Haber (2002) Defining the caudal ventral striatum in primates: cellular and histochemical features. *J Neurosci* 22(23): 10078-10082.
- Fujiyama, F. y S. Masuko (1996) Association of dopaminergic terminals and neurons releasing nitric oxide in the rat striatum: an electron microscopic study using NADPH-diaphorase histochemistry and tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res Bull* 40(2): 121-127.
- Galarraga, E., S. Hernández-López, A. Reyes, I. Miranda, F. Bermudez-Rattoni, C. Vilchis y J. Bargas (1999) Cholinergic modulation of neostriatal output: a

- functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19(9): 3629-3638.
- Garthwaite, J. y C. L. Boulton (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57: 683-706.
- Geneser-Jensen, F. A. y T. W. Blackstad (1971) Distribution of acetyl cholinesterase in the hippocampal region of the guinea pig. I. Entorhinal area, parasubiculum, and presubiculum. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 114(4): 460-481.
- Gerardin, E., S. Lehericy, J. B. Pochon, S. Tezenas du Montcel, J. F. Mangin, F. Poupon, Y. Agid, D. Le Bihan y C. Marsault (2003) Foot, hand, face and eye representation in the human striatum. *Cereb Cortex* 13(2): 162-169.
- Gerfen, C. R. (1989) The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science* 246(4928): 385-388.
- Gerfen, C. R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15(4): 133-139.
- Gerfen, C. R., K. G. Baimbridge y J. J. Miller (1985) The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(24): 8780-8784.
- Gerfen, C. R., J. F. McGinty y W. S. Young, 3rd (1991) Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: in situ hybridization histochemical analysis. *J Neurosci* 11(4): 1016-1031.
- Gerfen, C. R., T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, Jr. y D. R. Sibley (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250(4986): 1429-1432.
- Geula, C., C. R. Schatz y M. M. Mesulam (1993) Differential localization of NADPH-diaphorase and calbindin-D28k within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. *Neuroscience* 54(2): 461-476.
- Giménez-Amaya, J. M. (1991) The association cortex and the basal ganglia: a neuroanatomical view upon their relationship based on hodological studies. *J Hirnforsch* 32(4): 501-510.
- Giménez-Amaya, J. M. (1993) Histochemical assessment upon the striatal distribution of acetylcholinesterase in the cat. *Arch Ital Biol* 131(1): 61-66.



- Giménez-Amaya, J. M. y A. M. Graybiel (1990) Compartmental origins of the striatopallidal projection in the primate. *Neuroscience* 34(1): 111-126.
- Giménez-Amaya, J. M. y A. M. Graybiel (1991) Modular organization of projection neurons in the matrix compartment of the primate striatum. *J Neurosci* 11(3): 779-791.
- Giménez-Amaya, J. M., N. R. McFarland, S. de las Heras y S. N. Haber (1995) Organization of thalamic projections to the ventral striatum in the primate. *J Comp Neurol* 354(1): 127-149.
- Giménez-Amaya, J. M., S. de las Heras, E. Erro, E. Mengual y J. L. Lanciego (2000) Considerations on the thalamostriatal system with some functional implications. *Histol Histopathol* 15(4): 1285-1292.
- Goldman, P. S. y W. J. Nauta (1977) An intricately patterned prefronto-caudate projection in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 72(3): 369-386.
- Goldman-Rakic, P. S. y L. D. Selemon (1990) New frontiers in basal ganglia research. Introduction. *Trends Neurosci* 13(7): 241-244.
- Goodman, R. R. y G. W. Pasternak (1985) Visualization of mu1 opiate receptors in rat brain by using a computerized autoradiographic subtraction technique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(19): 6667-6671.
- Graveland, G. A. y M. DiFiglia (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res* 327(1-2): 307-311.
- Graybiel, A. M. (1989) Dopaminergic and cholinergic systems in the striatum. *Neural Mechanism in Disorders of Movement*. Crossman, A. R. y M. A. Sambrook. London, Libbey: 3-15.
- Graybiel, A. M. (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13(7): 244-254.
- Graybiel, A. M. y C. W. Ragsdale, Jr. (1978) Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(11): 5723-5726.
- Graybiel, A. M. y C. W. Ragsdale, Jr. (1979) Fiber connections of the basal ganglia. *Prog Brain Res* 51: 237-283.

- Graybiel, A. M. y M. F. Chesselet (1984) Compartmental distribution of striatal cell bodies expressing [Met]enkephalin-like immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(24): 7980-7984.
- Graybiel, A. M. y R. Moratalla (1989) Dopamine uptake sites in the striatum are distributed differentially in striosome and matrix compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(22): 9020-9024.
- Graybiel, A. M., R. W. Baughman y F. Eckenstein (1986) Cholinergic neuropil of the striatum observes striosomal boundaries. *Nature* 323(6089): 625-627.
- Graybiel, A. M., A. W. Flaherty y J. M. Giménez-Amaya (1991) Striosomes and matrisomes. *The Basal Ganglia III*. Carpenter, M., G. Di Chiara, M. Morelli y P. Stanzioni. New York, Plenum Press: 3-12.
- Graybiel, A. M., V. M. Pickel, T. H. Joh, D. J. Reis y C. W. Ragsdale, Jr. (1981) Direct demonstration of a correspondence between the dopamine islands and acetylcholinesterase patches in the developing striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9): 5871-5875.
- Groves, P. M. (1983) A theory of the functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movement. *Brain Res* 286(2): 109-132.
- Haber, S. N. (1986) Neurotransmitters in the human and nonhuman primate basal ganglia. *Hum Neurobiol* 5(3): 159-168.
- Haber, S. N. (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat* 26(4): 317-330.
- Haber, S. N. y S. J. Watson (1985) The comparative distribution of enkephalin, dynorphin and substance P in the human globus pallidus and basal forebrain. *Neuroscience* 14(4): 1011-1024.
- Haber, S. N. y M. Johnson (2004) The basal ganglia. *The human nervous system*. Paxinos, G. y J. Mai. San Diego, Elsevier Academic Press: 676-738.
- Haber, S. N., D. P. Wolfe y H. J. Groenewegen (1990) The relationship between ventral striatal efferent fibers and the distribution of peptide-positive woolly fibers in the forebrain of the rhesus monkey. *Neuroscience* 39(2): 323-338.
- Haines, D. (2003) *Principios de Neurociencia*. Madrid, Elsevier España.
- Hattori, T., E. G. McGeer y P. L. McGeer (1979) Fine structural analysis of the cortico-striatal pathway. *J Comp Neurol* 185(2): 347-353.

- Hedreen, J. C. y M. R. DeLong (1991) Organization of striatopallidal, striatonigral, and nigrostriatal projections in the macaque. *J Comp Neurol* 304(4): 569-595.
- Heimer, L., D. S. Zahm, L. Churchill, P. W. Kalivas y C. Wohltmann (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41(1): 89-125.
- Heimer, L., J. De Olmos, G. Alheid, J. Pearson, S. Sakamoto, K. Shinoda, J. Marksteiner y R. I. Switzer (1999) The human basal forebrain. Part II. *Handbook of chemical Neuroanatomy. Vol. 15, the primate nervous system, part 3.* Bloom, F., A. Bjorklund y T. Hokfelt. Amsterdam, Elsevier: 57-226.
- Herkenham, M. y C. B. Pert (1981) Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* 291(5814): 415-418.
- Hernández-Echeagaray, E., E. Galarraga y J. Bargas (1998) 3-Alpha-chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology* 37(12): 1493-1502.
- Hernández-López, S., J. Bargas, D. J. Surmeier, A. Reyes y E. Galarraga (1997) D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type  $Ca^{2+}$  conductance. *J Neurosci* 17(9): 3334-3342.
- Hidaka, S. y S. Totterdell (2001) Ultrastructural features of the nitric oxide synthase-containing interneurons in the nucleus accumbens and their relationship with tyrosine hydroxylase-containing terminals. *J Comp Neurol* 431(2): 139-154.
- Holt, D. J., L. B. Hersh y C. B. Saper (1996) Cholinergic innervation in the human striatum: a three-compartment model. *Neuroscience* 74(1): 67-87.
- Holt, D. J., A. M. Graybiel y C. B. Saper (1997) Neurochemical architecture of the human striatum. *J Comp Neurol* 384(1): 1-25.
- Holt, D. J., S. E. Bachus, T. M. Hyde, M. Wittie, M. M. Herman, M. Vangel, C. B. Saper y J. E. Kleinman (2005) Reduced density of cholinergic interneurons in the ventral striatum in schizophrenia: an in situ hybridization study. *Biol Psychiatry* 58(5): 408-416.
- Holt, D. J., M. M. Herman, T. M. Hyde, J. E. Kleinman, C. M. Sinton, D. C. German, L. B. Hersh, A. M. Graybiel y C. B. Saper (1999) Evidence for a deficit in

- cholinergic interneurons in the striatum in schizophrenia. *Neuroscience* 94(1): 21-31.
- Hontanilla, B., S. de las Heras y J. M. Giménez-Amaya (1994) Organization of the striatal projections from the rostral caudate nucleus to the globus pallidus, the entopeduncular nucleus, and the pars reticulata of the substantia nigra in the cat. *Anat Rec* 238(1): 114-124.
- Hontanilla, B., S. de las Heras y J. M. Giménez-Amaya (1996) A topographic re-evaluation of the nigrostriatal projections to the caudate nucleus in the cat with multiple retrograde tracers. *Neuroscience* 72(2): 485-503.
- Hoover, J. E. y P. L. Strick (1993) Multiple output channels in the basal ganglia. *Science* 259(5096): 819-821.
- Hope, B. T., G. J. Michael, K. M. Knigge y S. R. Vincent (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2811-2814.
- Hornykiewicz, O. (1975) Brain monoamines and parkinsonism. *Natl Inst Drug Abuse Res Monogr Ser*(3): 13-21.
- Hornykiewicz, O. (2001) Chemical neuroanatomy of the basal ganglia--normal and in Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat* 22(1-2): 3-12.
- Hoyer, D., G. I. Bell, M. Berelowitz, J. Epelbaum, W. Feniuk, P. P. Humphrey, A. M. O'Carroll, Y. C. Patel, A. Schonbrunn, J. E. Taylor y et al. (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 16(3): 86-88.
- Hsu, S. M., L. Raine y H. Fanger (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29(4): 577-580.
- Hurd, Y. L. y M. Herkenham (1995) The human neostriatum shows compartmentalization of neuropeptide gene expression in dorsal and ventral regions: an in situ hybridization histochemical analysis. *Neuroscience* 64(3): 571-586.
- Hussain, Z., L. R. Johnson y S. Totterdell (1996) A light and electron microscopic study of NADPH-diaphorase-, calretinin- and parvalbumin-containing neurons in the rat nucleus accumbens. *J Chem Neuroanat* 10(1): 19-39.
- Jaeger, D., H. Kita y C. J. Wilson (1994) Surround inhibition among projection neurons is weak or nonexistent in the rat neostriatum. *J Neurophysiol* 72(5): 2555-2558.

- Jakab, R. L., L. N. Hazrati y P. Goldman-Rakic (1996) Distribution and neurochemical character of substance P receptor (SPR)-immunoreactive striatal neurons of the macaque monkey: accumulation of SP fibers and SPR neurons and dendrites in "striocapsules" encircling striosomes. *J Comp Neurol* 369(1): 137-149.
- Johannes, S., A. Reif, D. Senitz, P. Riederer y M. Lauer (2003) NADPH-diaphorase staining reveals new types of interneurons in human putamen. *Brain Res* 980(1): 92-99.
- Jones, E. G. y S. H. Hendry (1989) Differential Calcium Binding Protein Immunoreactivity Distinguishes Classes of Relay Neurons in Monkey Thalamic Nuclei. *Eur J Neurosci* 1(3): 222-246.
- Jones, E. G., J. D. Coulter, H. Burton y R. Porter (1977) Cells of origin and terminal distribution of corticostriatal fibers arising in the sensory-motor cortex of monkeys. *J Comp Neurol* 173(1): 53-80.
- Kalil, K. (1978) Patch-like termination of thalamic fibers in the putamen of the rhesus monkey: an autoradiographic study. *Brain Res* 140(2): 333-339.
- Kawaguchi, Y. (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13(11): 4908-4923.
- Kawaguchi, Y. (1997) Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res* 27(1): 1-8.
- Kawaguchi, Y., C. J. Wilson y P. C. Emson (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10(10): 3421-3438.
- Kawaguchi, Y., C. J. Wilson, S. J. Augood y P. C. Emson (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18(12): 527-535.
- Kelley, A. E., B. A. Baldo y W. E. Pratt (2005) A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal, and food reward. *J Comp Neurol* 493(1): 72-85.
- Kemel, M. L., S. Pérez, G. Godeheu, P. Soubrie y J. Glowinski (2002) Facilitation by endogenous tachykinins of the NMDA-evoked release of acetylcholine after acute and chronic suppression of dopaminergic transmission in the matrix of the rat striatum. *J Neurosci* 22(5): 1929-1936.

- Kemp, J. M. y T. P. Powell (1970) The cortico-striate projection in the monkey. *Brain* 93(3): 525-546.
- Kemp, J. M. y T. P. Powell (1971a) The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262(845): 441-457.
- Kemp, J. M. y T. P. Powell (1971b) The site of termination of afferent fibres in the caudate nucleus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262(845): 413-427.
- Kemp, J. M. y T. P. Powell (1971c) The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262(845): 383-401.
- Kerkerian, L., O. Bosler, G. Pelletier y A. Nieoullon (1986) Striatal neuropeptide Y neurones are under the influence of the nigrostriatal dopaminergic pathway: immunohistochemical evidence. *Neurosci Lett* 66(1): 106-112.
- Kimura, H., P. L. McGeer, F. Peng y E. G. McGeer (1980) Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science* 208(4447): 1057-1059.
- Kimura, H., P. L. McGeer, J. H. Peng y E. G. McGeer (1981) The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J Comp Neurol* 200(2): 151-201.
- Kimura, M. (1990) Behaviorally contingent property of movement-related activity of the primate putamen. *J Neurophysiol* 63(6): 1277-1296.
- Kimura, M. (1992) Behavioral modulation of sensory responses of primate putamen neurons. *Brain Res* 578(1-2): 204-214.
- Kimura, M., J. Rajkowski y E. Evarts (1984) Tonically discharging putamen neurons exhibit set-dependent responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(15): 4998-5001.
- Kimura, M., H. Yamada y N. Matsumoto (2003) Tonically active neurons in the striatum encode motivational contexts of action. *Brain Dev* 25 Suppl 1: S20-23.
- Kincaid, A. E. y C. J. Wilson (1996) Corticostriatal innervation of the patch and matrix in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 374(4): 578-592.
- Kita, H. (1993) GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res* 99: 51-72.
- Kita, H., T. Kosaka y C. W. Heizmann (1990) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 536(1-2): 1-15.

- Kiyama, H., A. Seto-Ohshima y P. C. Emson (1990) Calbindin D28K as a marker for the degeneration of the striatonigral pathway in Huntington's disease. *Brain Res* 525(2): 209-214.
- Kölliker, A. (1896) *Handbuch der gewebelehre des menschen*. Leipzig, Engelmann.
- Koós, T. y J. M. Tepper (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2(5): 467-472.
- Koós, T. y J. M. Tepper (2002) Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci* 22(2): 529-535.
- Koós, T., J. M. Tepper y C. J. Wilson (2004) Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24(36): 7916-7922.
- Kowall, N. W., R. J. Ferrante, M. F. Beal, E. P. Richardson, Jr., M. V. Sofroniew, A. C. Cuello y J. B. Martin (1987) Neuropeptide Y, somatostatin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. *Neuroscience* 20(3): 817-828.
- Kubota, Y. y Y. Kawaguchi (1993) Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J Comp Neurol* 332(4): 499-513.
- Kubota, Y. y Y. Kawaguchi (2000) Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. *J Neurosci* 20(1): 375-386.
- Kubota, Y., S. Inagaki, S. Kito y J. Y. Wu (1987a) Dopaminergic axons directly make synapses with GABAergic neurons in the rat neostriatum. *Brain Res* 406(1-2): 147-156.
- Kubota, Y., S. Inagaki, S. Shimada, S. Kito, F. Eckenstein y M. Tohyama (1987b) Neostriatal cholinergic neurons receive direct synaptic inputs from dopaminergic axons. *Brain Res* 413(1): 179-184.
- Kunzle, H. (1975) Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Macaca fascicularis*. *Brain Res* 88(2): 195-209.
- Kunzle, H. (1977) Projections from the primary somatosensory cortex to basal ganglia and thalamus in the monkey. *Exp Brain Res* 30(4): 481-492.

- Lapper, S. R. y J. P. Bolam (1992) Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience* 51(3): 533-545.
- Lauer, M., S. Johannes, S. Fritzen, D. Senitz, P. Riederer y A. Reif (2005) Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients. *Neuropsychobiology* 52(3): 111-117.
- Lavoie, B. y A. Parent (1990) Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 299(1): 1-16.
- Lehericy, S., E. C. Hirsch, P. Cervera, L. B. Hersch, J. J. Hauw, M. Ruberg y Y. Agid (1989) Selective loss of cholinergic neurons in the ventral striatum of patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(21): 8580-8584.
- Lehericy, S., E. Bardin, L. Tremblay, P. F. Van de Moortele, J. B. Pochon, D. Dormont, D. S. Kim, J. Yelnik y K. Ugurbil (2006) Motor control in basal ganglia circuits using fMRI and brain atlas approaches. *Cereb Cortex* 16(2): 149-161.
- Lehericy, S., P. F. van de Moortele, E. Lobel, A. L. Paradis, M. Vidailhet, V. Frouin, P. Neveu, Y. Agid, C. Marsault y D. Le Bihan (1998) Somatotopical organization of striatal activation during finger and toe movement: a 3-T functional magnetic resonance imaging study. *Ann Neurol* 44(3): 398-404.
- Lehmann, E., J. Hanze, M. Pauschinger, D. Ganten y R. E. Lang (1990) Vasopressin mRNA in the neurolobe of the rat pituitary. *Neurosci Lett* 111(1-2): 170-175.
- Lévesque, M. y A. Parent (2005) The striatofugal fiber system in primates: a reevaluation of its organization based on single-axon tracing studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(33): 11888-11893.
- Lévesque, M., M. J. Wallman y A. Parent (2004) Striosomes are enriched in glutamic acid decarboxylase in primates. *Neurosci Res* 50(1): 29-35.
- Levey, A. I., B. H. Wainer, E. J. Mufson y M. M. Mesulam (1983) Co-localization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat cerebrum. *Neuroscience* 9(1): 9-22.
- Li, J. L., T. Kaneko y N. Mizuno (2002a) Synaptic association of dopaminergic axon terminals and neurokinin-1 receptor-expressing intrinsic neurons in the striatum of the rat. *Neurosci Lett* 324(1): 9-12.



- Li, J. L., Y. L. Dong, T. Kaneko y N. Mizuno (2002b) Direct projections from substance P-containing neurons to nitric oxide synthase-containing interneurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* 318(3): 133-136.
- Mai, J., J. Assheuer y G. Paxinos (1997) *Atlas of the human brain*. San Diego, California, Academic Press.
- Martin, J. L., M. F. Chesselet, K. Raynor, C. Gonzales y T. Reisine (1991) Differential distribution of somatostatin receptor subtypes in rat brain revealed by newly developed somatostatin analogs. *Neuroscience* 41(2-3): 581-593.
- Martin, R., B. Fraile, F. Peinado, M. I. Arenas, M. Elices, L. Alonso, R. Paniagua, J. J. Martin y L. Santamaria (2000) Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5, ubiquitin, and neuropeptide Y immunoreactivities in epithelial and neuroendocrine cells from normal and hyperplastic human prostate. *J Histochem Cytochem* 48(8): 1121-1130.
- Martone, M. E., D. M. Armstrong, S. J. Young y P. M. Groves (1992) Ultrastructural examination of enkephalin and substance P input to cholinergic neurons within the rat neostriatum. *Brain Res* 594(2): 253-262.
- Martone, M. E., D. M. Armstrong, S. J. Young y P. M. Groves (1993) Cholinergic neurons are distributed preferentially in areas rich in substance P-like immunoreactivity in the caudate nucleus of the adult cat. *Neuroscience* 56(3): 567-579.
- Martone, M. E., S. J. Young, D. M. Armstrong y P. M. Groves (1994) The distribution of cholinergic perikarya with respect to enkephalin-rich patches in the caudate nucleus of the adult cat. *J Chem Neuroanat* 8(1): 47-59.
- Mayhew, T. M. y A. K. Sharma (1984a) Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J Anat* 139 ( Pt 1): 59-66.
- Mayhew, T. M. y A. K. Sharma (1984b) Sampling schemes for estimating nerve fibre size. I. Methods for nerve trunks of mixed fascicularity. *J Anat* 139 ( Pt 1): 45-58.
- Mayhew, T. M. y H. J. Gundersen (1996) If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat* 188 ( Pt 1): 1-15.

- Mazloom, M. y Y. Smith (2006) Synaptic microcircuitry of tyrosine hydroxylase-containing neurons and terminals in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys. *J Comp Neurol* 495(4): 453-469.
- McFarland, N. R. y S. N. Haber (2000) Convergent inputs from thalamic motor nuclei and frontal cortical areas to the dorsal striatum in the primate. *J Neurosci* 20(10): 3798-3813.
- McFarland, N. R. y S. N. Haber (2001) Organization of thalamostriatal terminals from the ventral motor nuclei in the macaque. *J Comp Neurol* 429(2): 321-336.
- McGeer, P. L. y E. G. McGeer (1977) Possible changes in striatal and limbic cholinergic systems in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 34(11): 1319-1323.
- Melchitzky, D. S. y D. A. Lewis (2001) Dopamine transporter-immunoreactive axons in the mediodorsal thalamic nucleus of the macaque monkey. *Neuroscience* 103(4): 1033-1042.
- Mengual, E., S. de las Heras, E. Erro, J. L. Lanciego y J. M. Giménez-Amaya (1999) Thalamic interaction between the input and the output systems of the basal ganglia. *J Chem Neuroanat* 16(3): 187-200.
- Mensah, P. L. (1977) The internal organization of the mouse caudate nucleus: evidence for cell clustering and regional variation. *Brain Res* 137(1): 53-66.
- Mesulam, M. M., E. J. Mufson, A. I. Levey y B. H. Wainer (1984) Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience* 12(3): 669-686.
- Mesulam, M. M., D. Mash, L. Hersh, M. Bothwell y C. Geula (1992) Cholinergic innervation of the human striatum, globus pallidus, subthalamic nucleus, substantia nigra, and red nucleus. *J Comp Neurol* 323(2): 252-268.
- Miyachi, S., O. Hikosaka y X. Lu (2002) Differential activation of monkey striatal neurons in the early and late stages of procedural learning. *Exp Brain Res* 146(1): 122-126.
- Monchi, O., M. Petrides, V. Petre, K. Worsley y A. Dagher (2001) Wisconsin Card Sorting revisited: distinct neural circuits participating in different stages of the task identified by event-related functional magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 21(19): 7733-7741.

- Morel, A., F. Loup, M. Magnin y D. Jeanmonod (2002) Neurochemical organization of the human basal ganglia: anatomofunctional territories defined by the distributions of calcium-binding proteins and SMI-32. *J Comp Neurol* 443(1): 86-103.
- Morris, G., D. Arkadir, A. Nevet, E. Vaadia y H. Bergman (2004) Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron* 43(1): 133-143.
- Mounir, S. y A. Parent (2002) The expression of neurokinin-1 receptor at striatal and pallidal levels in normal human brain. *Neurosci Res* 44(1): 71-81.
- Muiño, L. y L. Prensa (2004) Distribution of the large-sized calbindin D-28k immunoreactive neurons in the human striatum. Program No. 754.13. 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience. Online.
- Murrin, L. C. y W. Y. Zeng (1989) Dopamine D1 receptor development in the rat striatum: early localization in striosomes. *Brain Res* 480(1-2): 170-177.
- Nagatsu, T. y L. Stjarne (1998) Catecholamine synthesis and release. Overview. *Adv Pharmacol* 42: 1-14.
- Nauta, W. J. (1982) Limbic innervation of the striatum. *Adv Neurol* 35: 41-47.
- Nisenbaum, E. S. y T. W. Berger (1992) Functionally distinct subpopulations of striatal neurons are differentially regulated by GABAergic and dopaminergic inputs--I. In vivo analysis. *Neuroscience* 48(3): 561-578.
- Nowinski, W., R. Bryan y R. Raghavan (1997) The electronic clinical brain atlas. Version 1.0. Three-dimensional navigation of the human brain. Stuttgart (Germany), Georg Thieme.
- Olson, L., A. Seiger y K. Fuxe (1972) Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation: highly fluorescent islands in developing and adult rats. *Brain Res* 44(1): 283-288.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige y S. Moncada (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122): 524-526.
- Parent, A. (1990) Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13(7): 254-258.

- Parent, A. y L. N. Hazrati (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20(1): 91-127.
- Parent, A., F. Cicchetti y T. G. Beach (1995) Calretinin-immunoreactive neurons in the human striatum. *Brain Res* 674(2): 347-351.
- Parent, A., M. Fortin, P. Y. Côté y F. Cicchetti (1996) Calcium-binding proteins in primate basal ganglia. *Neurosci Res* 25(4): 309-334.
- Parent, M. y A. Parent (2005) Single-axon tracing and three-dimensional reconstruction of centre median-parafascicular thalamic neurons in primates. *J Comp Neurol* 481(1): 127-144.
- Parthasarathy, H. B., J. D. Schall y A. M. Graybiel (1992) Distributed but convergent ordering of corticostriatal projections: analysis of the frontal eye field and the supplementary eye field in the macaque monkey. *J Neurosci* 12(11): 4468-4488.
- Penny, G. R., S. Afsharpour y S. T. Kitai (1986) The glutamate decarboxylase-, leucine enkephalin-, methionine enkephalin- and substance P-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: evidence for partial population overlap. *Neuroscience* 17(4): 1011-1045.
- Penny, G. R., C. J. Wilson y S. T. Kitai (1988) Relationship of the axonal and dendritic geometry of spiny projection neurons to the compartmental organization of the neostriatum. *J Comp Neurol* 269(2): 275-289.
- Percheron, G. y M. Filion (1991) Parallel processing in the basal ganglia: up to a point. *Trends Neurosci* 14(2): 55-59.
- Pérez-Roselló, T., A. Figueroa, H. Salgado, C. Vilchis, F. Tecuapetla, J. N. Guzmán, E. Galarraga y J. Bargas (2005) Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurophysiol* 93(5): 2507-2519.
- Pert, C. B., M. J. Kuhar y S. H. Snyder (1975) Autoradiographic localization of the opiate receptor in rat brain. *Life Sci* 16(12): 1849-1853.
- Pert, C. B., M. J. Kuhar y S. H. Snyder (1976) Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(10): 3729-3733.
- Pickel, V. M., J. Chan y S. R. Sesack (1992) Cellular basis for interactions between catecholaminergic afferents and neurons containing Leu-enkephalin-like immunoreactivity in rat caudate-putamen nuclei. *J Neurosci Res* 31(2): 212-230.

- Pisani, A., P. Bonsi, B. Picconi, M. Tolu, P. Giacomini y E. Scarnati (2001) Role of tonically-active neurons in the control of striatal function: cellular mechanisms and behavioral correlates. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25(1): 211-230.
- Pisani, A., P. Bonsi, D. Centonze, P. Gubellini, G. Bernardi y P. Calabresi (2003) Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 45(1): 45-56.
- Prensa, L. (1998) Estudio morfológico de la compartimentalización histoquímica e inmunohistoquímica del estriado humano, Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Prensa, L. y A. Parent (2001) The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci* 21(18): 7247-7260.
- Prensa, L., J. M. Giménez-Amaya y A. Parent (1998) Morphological features of neurons containing calcium-binding proteins in the human striatum. *J Comp Neurol* 390(4): 552-563.
- Prensa, L., J. M. Giménez-Amaya y A. Parent (1999) Chemical heterogeneity of the striosomal compartment in the human striatum. *J Comp Neurol* 413(4): 603-618.
- Prensa, L., M. Cossette y A. Parent (2000) Dopaminergic innervation of human basal ganglia. *J Chem Neuroanat* 20(3-4): 207-213.
- Prensa, L., S. Richard y A. Parent (2003) Chemical anatomy of the human ventral striatum and adjacent basal forebrain structures. *J Comp Neurol* 460(3): 345-367.
- Rafols, J. A. y C. A. Fox (1979) Fine structure of the primate striatum. *Appl Neurophysiol* 42(1-2): 13-16.
- Ragsdale, C. W., Jr. y A. M. Graybiel (1991) Compartmental organization of the thalamostriatal connection in the cat. *J Comp Neurol* 311(1): 134-167.
- Ramanathan, S., J. J. Hanley, J. M. Deniau y J. P. Bolam (2002) Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto GABAergic interneurons in the rat striatum. *J Neurosci* 22(18): 8158-8169.
- Ramón y Cajal, S. (1904) Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados : estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros

- nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos. Madrid, Imprenta y librería de Nicolás Moya.
- Reith, A. y M. Boysen (1984) A general model for the light and electron microscopic morphometry/stereology (M & S) of precancerous epithelial transformation using clinical biopsies. *Pathol Res Pract* 179(2): 210-215.
- Rivera, A., I. Alberti, A. B. Martin, J. A. Narvaez, A. de la Calle y R. Moratalla (2002) Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur J Neurosci* 16(11): 2049-2058.
- Roberts, R. C. y M. DiFiglia (1990) Long-term survival of GABA-, enkephalin-, NADPH-diaphorase- and calbindin-d28k-containing neurons in fetal striatal grafts. *Brain Res* 532(1-2): 151-159.
- Roberts, R. C. y J. K. Knickman (2002) The ultrastructural organization of the patch matrix compartments in the human striatum. *J Comp Neurol* 452(2): 128-138.
- Roberts, R. C., J. K. Roche y R. R. Conley (2005a) Synaptic differences in the patch matrix compartments of subjects with schizophrenia: a postmortem ultrastructural study of the striatum. *Neurobiol Dis* 20(2): 324-335.
- Roberts, R. C., J. K. Roche y R. R. Conley (2005b) Synaptic differences in the postmortem striatum of subjects with schizophrenia: a stereological ultrastructural analysis. *Synapse* 56(4): 185-197.
- Roberts, R. C., L. A. Gaither, F. J. Peretti, B. Lapidus y D. J. Chute (1996) Synaptic organization of the human striatum: a postmortem ultrastructural study. *J Comp Neurol* 374(4): 523-534.
- Rolls, E. T. (1994) Neurophysiology and cognitive functions of the striatum. *Rev Neurol (Paris)* 150(8-9): 648-660.
- Royce, G. J. (1978a) Autoradiographic evidence for a discontinuous projection to the caudate nucleus from the centromedian nucleus in the cat. *Brain Res* 146(1): 145-150.
- Royce, G. J. (1978b) Cells of origin of subcortical afferents to the caudate nucleus: a horseradish peroxidase study in the cat. *Brain Res* 153(3): 465-475.
- Rushlow, W., B. A. Flumerfelt y C. C. Naus (1995) Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH-diaphorase in the caudate-putamen of the rat. *J Comp Neurol* 351(4): 499-508.

- Sadikot, A. F., A. Parent, Y. Smith y J. P. Bolam (1992) Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: a light and electron microscopic study of the thalamostriatal projection in relation to striatal heterogeneity. *J Comp Neurol* 320(2): 228-242.
- Saint-Cyr, J. A., L. G. Ungerleider y R. Desimone (1990) Organization of visual cortical inputs to the striatum and subsequent outputs to the pallido-nigral complex in the monkey. *J Comp Neurol* 298(2): 129-156.
- Saka, E. y A. M. Graybiel (2003) Pathophysiology of Tourette's syndrome: striatal pathways revisited. *Brain Dev* 25 Suppl 1: S15-19.
- Saka, E., M. Iadarola, D. J. Fitzgerald y A. M. Graybiel (2002) Local circuit neurons in the striatum regulate neural and behavioral responses to dopaminergic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 9004-9009.
- Sandell, J. H., A. M. Graybiel y M. F. Chesselet (1986) A new enzyme marker for striatal compartmentalization: NADPH diaphorase activity in the caudate nucleus and putamen of the cat. *J Comp Neurol* 243(3): 326-334.
- Sanides, F. (1957) [Insulae terminales in the brain of adults.]. *J Hirnforsch* 3(2-3): 243-273.
- Schaltenbrand, G. y W. Wahren (1977) Atlas for stereotaxy of the human brain. Stuttgart (Germany), Thieme.
- Scherer-Singler, U., S. R. Vincent, H. Kimura y E. G. McGeer (1983) Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods* 9(3): 229-234.
- Seger, C. A. y C. M. Cincotta (2005) The roles of the caudate nucleus in human classification learning. *J Neurosci* 25(11): 2941-2951.
- Selden, N., M. M. Mesulam y C. Geula (1994a) Human striatum: the distribution of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 648(2): 327-331.
- Selden, N., C. Geula, L. Hersh y M. M. Mesulam (1994b) Human striatum: chemoarchitecture of the caudate nucleus, putamen and ventral striatum in health and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 60(3): 621-636.
- Selemon, L. D. y P. S. Goldman-Rakic (1985) Longitudinal topography and interdigitation of corticostriatal projections in the rhesus monkey. *J Neurosci* 5(3): 776-794.

- Seto-Ohshima, A., P. C. Emson, E. Lawson, C. Q. Mountjoy y L. H. Carrasco (1988) Loss of matrix calcium-binding protein-containing neurons in Huntington's disease. *Lancet* 1(8597): 1252-1255.
- Sidibe, M. y Y. Smith (1999) Thalamic inputs to striatal interneurons in monkeys: synaptic organization and co-localization of calcium binding proteins. *Neuroscience* 89(4): 1189-1208.
- Smith, A. D. y J. P. Bolam (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13(7): 259-265.
- Smith, Y. y A. Parent (1986) Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Res* 372(2): 241-252.
- Somogyi, P., J. P. Bolam, S. Totterdell y A. D. Smith (1981) Monosynaptic input from the nucleus accumbens--ventral striatum region to retrogradely labelled nigrostriatal neurones. *Brain Res* 217(2): 245-263.
- Steiner, H. y C. R. Gerfen (1998) Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. *Exp Brain Res* 123(1-2): 60-76.
- Sterio, D. C. (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134 ( Pt 2): 127-136.
- Sugimoto, T. y N. Mizuno (1987) Neurotensin in projection neurons of the striatum and nucleus accumbens, with reference to coexistence with enkephalin and GABA: an immunohistochemical study in the cat. *J Comp Neurol* 257(3): 383-395.
- Takada, M., K. Itoh, T. Sugimoto y N. Mizuno (1985) Topographical projections from the thalamus to the putamen in the cat. *Neurosci Lett* 54(2-3): 207-212.
- Tande, D., G. Hoglinger, T. Debeir, N. Freundlieb, E. C. Hirsch y C. Francois (2006) New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain*.
- Tennyson, V. M., R. E. Barrett, G. Cohen, L. Côté, R. Heikkila y C. Mytilineou (1972) The developing neostriatum of the rabbit: correlation of fluorescence histochemistry, electron microscopy, endogenous dopamine levels, and ( 3 H)dopamine uptake. *Brain Res* 46: 251-285.
- Tepper, J. M. y J. P. Bolam (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14(6): 685-692.



- Tepper, J. M., T. Koós y C. J. Wilson (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 27(11): 662-669.
- Tokuno, H., S. Chiken, K. Kametani y T. Moriizumi (2002) Efferent projections from the striatal patch compartment: anterograde degeneration after selective ablation of neurons expressing mu-opioid receptor in rats. *Neurosci Lett* 332(1): 5-8.
- Tokuno, H., M. Takada, T. Kaneko, R. Shigemoto y N. Mizuno (1996) Patchy distribution of substance P receptor immunoreactivity in the developing rat striatum. *Brain Res Dev Brain Res* 95(1): 107-117.
- Trabace, L. y K. M. Kendrick (2000) Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. *J Neurochem* 75(4): 1664-1674.
- Van Vulpén, E. H. y D. Van Der Kooy (1996) Differential maturation of cholinergic interneurons in the striatal patch versus matrix compartments. *J Comp Neurol* 365(4): 683-691.
- Vilchis, C., J. Bargas, T. Perez-Rosello, H. Salgado y E. Galarraga (2002) Somatostatin modulates Ca<sup>2+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 109(3): 555-567.
- Vincent, S. R., O. Johansson, T. Hokfelt, L. Skirboll, R. P. Elde, L. Terenius, J. Kimmel y M. Goldstein (1983) NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J Comp Neurol* 217(3): 252-263.
- Vuillet, J., L. Kerkerian, P. Salin y A. Nieoullon (1989a) Ultrastructural features of NPY-containing neurons in the rat striatum. *Brain Res* 477(1-2): 241-251.
- Vuillet, J., R. Dimova, A. Nieoullon y L. K. Goff (1992) Ultrastructural relationships between choline acetyltransferase- and neuropeptide y-containing neurons in the rat striatum. *Neuroscience* 46(2): 351-360.
- Vuillet, J., L. Kerkerian, P. Kachidian, O. Bosler y A. Nieoullon (1989b) Ultrastructural correlates of functional relationships between nigral dopaminergic or cortical afferent fibers and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* 100(1-3): 99-104.
- Waldvogel, H. J. y R. L. Faull (1993) Compartmentalization of parvalbumin immunoreactivity in the human striatum. *Brain Res* 610(2): 311-316.
- Waldvogel, H. J., A. Billinton, J. H. White, P. C. Emson y R. L. Faull (2004) Comparative cellular distribution of GABAA and GABAB receptors in the

- human basal ganglia: Immunohistochemical colocalization of the alpha1 subunit of the GABAA receptor, and the GABABR1 and GABABR2 receptor subunits. *J Comp Neurol* 470(4): 339-356.
- Walker, R. H. y A. M. Graybiel (1993) Dendritic arbors of spiny neurons in the primate striatum are directionally polarized. *J Comp Neurol* 337(4): 629-639.
- Walker, R. H., G. W. Arbuthnott, R. W. Baughman y A. M. Graybiel (1993) Dendritic domains of medium spiny neurons in the primate striatum: relationships to striosomal borders. *J Comp Neurol* 337(4): 614-628.
- Wang, H. B., A. V. Laverghetta, R. Foehring, Y. P. Deng, Z. Sun, K. Yamamoto, W. L. Lei, Y. Jiao y A. Reiner (2006) Single-cell RT-PCR, in situ hybridization histochemical, and immunohistochemical studies of substance P and enkephalin co-occurrence in striatal projection neurons in rats. *J Chem Neuroanat.*
- Warren, N. M., M. A. Piggott, E. K. Perry y D. J. Burn (2005) Cholinergic systems in progressive supranuclear palsy. *Brain* 128(Pt 2): 239-249.
- West, A. R. y A. A. Grace (2004) The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity States and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *J Neurosci* 24(8): 1924-1935.
- West, A. R., M. P. Galloway y A. A. Grace (2002) Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse* 44(4): 227-245.
- Wichmann, T. y M. R. DeLong (1996) Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 6(6): 751-758.
- Wichmann, T. y M. A. Kliem (2004) Neuronal activity in the primate substantia nigra pars reticulata during the performance of simple and memory-guided elbow movements. *J Neurophysiol* 91(2): 815-827.
- Widerlov, E., L. H. Lindstrom, C. Wahlestedt y R. Ekman (1988) Neuropeptide Y and peptide YY as possible cerebrospinal fluid markers for major depression and schizophrenia, respectively. *J Psychiatr Res* 22(1): 69-79.
- Wilson, C. J. y P. M. Groves (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194(3): 599-615.

- Wilson, C. J., H. T. Chang y S. T. Kitai (1990) Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci* 10(2): 508-519.
- Woolf, N. J. (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* 37(6): 475-524.
- Woolf, N. J. y L. L. Butcher (1986) Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res Bull* 16(5): 603-637.
- Wreford, N. G. (1995) Theory and practice of stereological techniques applied to the estimation of cell number and nuclear volume in the testis. *Microsc Res Tech* 32(5): 423-436.
- Wu, Y. y A. Parent (2000) Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin or NADPH-diaphorase: a comparative study in the rat, monkey and human. *Brain Res* 863(1-2): 182-191.
- Wu, Y., S. Richard y A. Parent (2000) The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci Res* 38(1): 49-62.
- Yamada, H., N. Matsumoto y M. Kimura (2004) Tonically active neurons in the primate caudate nucleus and putamen differentially encode instructed motivational outcomes of action. *J Neurosci* 24(14): 3500-3510.
- Yelnik, J., C. Francois y G. Percheron (1997) Spatial relationships between striatal axonal endings and pallidal neurons in macaque monkeys. *Adv Neurol* 74: 45-56.
- Yelnik, J., C. Francois, G. Percheron y D. Tande (1991) Morphological taxonomy of the neurons of the primate striatum. *J Comp Neurol* 313(2): 273-294.
- Yeterian, E. H. y D. N. Pandya (1998) Corticostriatal connections of the superior temporal region in rhesus monkeys. *J Comp Neurol* 399(3): 384-402.
- Zhou, F. M., C. J. Wilson y J. A. Dani (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol* 53(4): 590-605.